

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A TERMONOCICEPCIÓ VIZSGÁLATA
HAGYOMÁNYOS IN VITRO ÉS ÚJ, A
NOCICEPTÍV HŐKÜSZÖB MÉRÉSÉN ALAPULÓ
IN VIVO MÓDSZEREKKEL**



Dr. Pethő Gábor

**Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar,
Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet**

2017

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	4
1.1. Alapfogalmak a fájdalommal kapcsolatban	4
1.2. A nociceptorok fajtái, különös tekintettel a termonociceptorokra	5
1.3. A termonocicepció vizsgálómódszerei	7
1.3.1. A termonocicepció vizsgálómódszereinek elméleti háttere	7
1.3.2. Latenciaidő-mérésen alapuló állatkísérletes magatartási tesztek a termonocicepció vizsgálatára	8
1.3.3. A latenciaidő-mérésen alapuló termonociceptív magatartási tesztek hátrányai	12
1.3.4. A termális fájdalomküszöb mérésén alapuló magatartási tesztek	12
1.3.5. Korábbi próbálkozások a nociceptív hőküszöb mérésére állatban	14
1.4. A termális ingerekkel aktiválható ioncsatornák	15
1.4.1. TRPV1	15
1.4.1.1. A TRPV1-receptor általános jellemzői	15
1.4.1.2. A TRPV1-receptor foszforilációs státuszának szerepe a receptor válaszkészségének meghatározásában	17
1.4.1.3. TRPV1-antagonisták, mint potenciális, perifériás támadáspontú analgetikumok	18
1.4.1.4. A TRPV1 szerepe a forró ingerek detektálásában	19
1.4.1.5. A TRPV1-receptor által közvetített szenzoros deszenzibilizáció	22
1.4.2. TRPV2	23
1.4.3. TRPV3	24
1.4.4. TRPV4	25
1.4.5. TRPM3	26
1.4.6. Anoktamin 1	27
1.4.7. TRPM8	29
1.4.8. TRPA1	30
1.4.9. TRPC5	31
1.5. A peptiderg polimodális nociceptorok hármas funkciója	32
1.6. Bradikinin és prosztaglandinok: a polimodális nociceptorokat hővel szemben szenzibilizáló gyulladásos mediátorok prototípusai	33
2. ELŐZMÉNYEK, ÁLTALÁNOS CÉLKITÜZÉSEK, AZ ÉRTEKEZÉS LOGIKAI STRUKTÚRÁJA	35
3. IN VITRO VIZSGÁLATOK A NOCICEPTOROK FORRÓ INGERRE ADOTT VÁLASZÁVAL ÉS ANNAK SENZIBILIZÁCIÓJÁVAL KAPCSOLATBAN	37
3.1. Módszerek	37
3.2. A ciklooxygenáz-termékek szerepe a bradikinin hőszenszibilizáló hatásában izolált patkánybőr polimodális nociceptoraiban	40
3.2.1. Előzmények és célkitűzés	40
3.2.2. Eredmények	40
3.2.3. Megbeszélés	46
3.3. A nociceptorok termális szenzibilizációja és aktivációja közötti kapcsolat a bradikinin példáján: egy vonzó hipotézis	48
3.4. A PGE₂ és PGI₂ hatása a forró ingerrel kiváltott nociceptor-kisülésre és CGRP-felszabadulásra izolált patkánybőrben	51
3.4.1. Előzmények és célkitűzés	51
3.4.2. Eredmények	51
3.4.3. Megbeszélés	54
3.5. TRPV1-receptor-antagonisták hatása a stimulált CGRP-felszabadulásra izolált patkánybőrben	58
3.5.1. Előzmények és célkitűzés	58

3.5.2. Eredmények.....	59
3.5.3. Megbeszélés.....	63
3.6. Az in vitro kísérletek eredményei alapján levonható következtetések és fontosabb megállapítások.....	65
4. A MAGATARTÁSI NOCICEPTÍV HŐKÜSZÖB MÉRÉSÉRE ALKALMAS MŰSZEREK ÉS HŐKÜSZÖBCSÖKKENÉSEN ALAPULÓ TERMÁLIS ALLODYNIA-MODELLEK KIFEJLESZTÉSE ÉS VALIDÁLÁSA.....	67
4.1. Előzmények és célkitűzés.....	67
4.2. A nociceptív hőküszöb mérését alkalmazó patkánykísérletek közös metodikai elemei.....	67
4.3. Az emelkedő hőmérsékletű forró lap és a resiniferatoxinral kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-modell validálása patkányban.....	69
4.3.1. Célkitűzés.....	69
4.3.2. Módszerek.....	69
4.3.3. Eredmények és megbeszélés.....	72
4.4. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő és az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-modell validálása patkányban.....	81
4.4.1. Előzmények és célkitűzés.....	81
4.4.2. Módszerek.....	81
4.4.3. Eredmények és megbeszélés.....	83
4.5. A sebészi bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-modell validálása patkányban.....	89
4.5.1. Előzmények és célkitűzés.....	89
4.5.2. Módszerek.....	89
4.5.3. Eredmények és megbeszélés.....	90
4.6. TRPV1-receptor-antagonisták összehasonlító vizsgálata patkányban a nociceptív hőküszöb csökkenésén alapuló hőallodynia-modellekben.....	94
4.6.1. Előzmények és célkitűzés.....	94
4.6.2. Módszerek.....	94
4.6.3. Eredmények.....	95
4.6.4. Megbeszélés.....	99
4.7. A patkányban mért nociceptív hőküszöb csökkenésén alapuló termális allodynia-modellek összehasonlítása.....	101
4.8. A hőküszöbmérő készülékek és a termális allodynia-modellek validálása során nyert adatokból levonható következtetések.....	102
4.9. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő validálása egérfarkon történő hőküszöbmérésre és továbbfejlesztése egérfelfogó hengerek alkalmazásával.....	104
4.9.1. Előzmények és célkitűzések.....	104
4.9.2. Módszerek.....	104
4.9.3. Eredmények.....	107
4.9.4. Megbeszélés.....	110
4.9.5. Fontosabb következtetések.....	114
5. A NOCICEPTÍV HŐKÜSZÖB MÉRÉSÉNEK ALKALMAZÁSA A TRPV1-RECEPTOR FUNKCIÓJÁNAK ÉS A TERMONOCICEPCIÓ MECHANIZMUSAINAK VIZSGÁLATÁBAN.....	115
5.1. Módszerek.....	115
5.2. Az enyhe hőtraumával és a plantáris bemetszéssel kiváltott termális allodynia mediátorainak összehasonlító vizsgálata.....	125
5.2.1. Előzmények és célkitűzés.....	125
5.2.2. Eredmények és megbeszélés.....	125
5.2.3. Fontosabb következtetések.....	130

5.3. A TRPV1-csatornán ható zsírsavamidok vizsgálata in vitro és in vivo	130
5.3.1. Előzmények és célkitűzés	130
5.3.2. Eredmények	131
5.3.3. Megbeszélés és fontosabb következtetések	137
5.4. A protein-kináz A és a protein-kináz C szerepe a TRPV1-receptor érzékenységének meghatározásában in vitro és in vivo	139
5.4.1. Előzmények és célkitűzések	139
5.4.2. Eredmények	139
5.4.3. Megbeszélés	146
5.4.4. Fontosabb következtetések	148
5.5. A decentralizált nociceptorok kémiai stimulációjával kiváltott távoli antiallodyniás hatás vizsgálata	149
5.5.1. Előzmények és célkitűzés	149
5.5.2. A távoli antiallodyniás hatás vizsgálatának elvi sémája	150
5.5.3. Eredmények és megbeszélés	151
5.5.4. Fontosabb következtetések	162
5.6. A TRPV1- és a TRPA1-ioncsatornák szerepe egérben a nociceptív hőküszöb meghatározásában és a mustárolajjal kiváltott nociceptív reakciókban	163
5.6.1. Előzmények és célkitűzések	163
5.6.2. Eredmények és megbeszélés	163
5.6.3. Fontosabb következtetések	171
5.7. A TRPV1-receptor-agonistákkal kiváltott deszenzibilizáció vizsgálata a nociceptív hő- és hideg küszöb mérésével	172
5.7.1. Előzmények és célkitűzések	172
5.7.2. Eredmények és megbeszélés	172
5.7.3. Fontosabb következtetések	178
5.8. A nociceptív hőküszöb és a latenciaidő összehasonlító vizsgálata a carrageninnel kiváltott termális szenzibilizációban	178
5.8.1. Előzmények és célkitűzés	178
5.8.2. Módszerek	179
5.8.3. Eredmények és megbeszélés	179
5.8.4. Következtetés	180
6. A FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS FELISMERÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA	181
7. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	185
8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	186
9. IRODALOMJEGYZÉK	188
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	205

1. BEVEZETÉS

1.1. Alapfogalmak a fájdalommal kapcsolatban

A jelen értekezés a fájdalom állatkísérletes vizsgálata során nyert eredményeken alapul. A **fájdalom** erősen szubjektív és kellemetlen érzéskvalitás, jelentős emocionális komponenssel, amelyet (potenciálisan) szövetkárosító ingerek váltanak ki. E definícióból adódóan állatkísérletes körülmények között nem beszélhetünk fájdalomról, megfelelője a **nocicepció**, vagyis a (potenciálisan) szövetkárosító ingerek által kiváltott elkerülő, **nocifenzív magatartási reakció**, amely alapján feltételezhető, hogy az állat hasonló érzetet él át, mint fájdalom esetén az ember. Az elkerülő reakció lehet az ingerelt testrész (pl. végtag, farok) elhúzása, nyalása, rázása. A fájdalmat/nocicepciót kiváltó ingerek lehetnek termális (forró vagy fájdalmasan hideg), mechanikai és kémiai jellegűek, ennek megfelelően beszélhetünk termo-, mechano- és kemonocicepcióról. A fájdalmat kiváltó ingerek felfogására specializálódott idegvégződések a **nociceptorok**. Ezek primer afferens (**elsődleges érző-**) **neuronok** bőrben és a nyálkahártyákban levő **perifériás végződései**, amelyek **sejtteste** (szóma) az érző dúcokban (ganglion intervertebrale-k sorozata, ganglion trigeminale, ganglion jugulare és ganglion nodosum) van. Ezeknek a pszeudounipoláris neuronoknak – amelyek a fájdalompálya első neuronját jelentik – a sejttestéből kiinduló axon elágazik, a perifériás nyúlvány az innervált szövetbe fut, a centrális pedig a hátsó gyökerekben haladva a gerincvelő hátsó szarvi szürkeállományában (trigeminális, illetve vagális nociceptorok esetén agyi magvakban) levő **centrális terminálisban** végződik. Elfogadott az a terminológia is, mely szerint a nociceptor fogalmába nemcsak a perifériás idegvégződést, hanem az ahhoz kapcsolódó perifériás axont, sőt akár az egész nociceptív érzőneuron beleértik. A fájdalompálya második neuronját azok a projekciós neuronok képezik, amelyek a primer afferensek centrális végződésétől kapják az információt, amelyet a thalamusba vezetnek. A harmadik neuron pedig a thalamusból a szenzoros cortexbe szállítja az információt (a fájdalompályák egyéb formái is léteznek, ezek ismertetésétől eltekintünk). A **hipoalgézia**, analgészia a fájdalmas ingerek által kiváltott csökkent fájdalomérzetet, illetve a fájdalomérzet hiányát jelenti, míg a **hiperalgészia** az enyhe fájdalmas ingerek által kiváltott fokozott fájdalomérzetet; a tesztingernek megfelelően lehet termális, mechanikai vagy kémiai. Az **allodynia** – egészséges szervezetben – nem-fájdalmas ingerekkel kiváltott fájdalomérzet, amely szintén lehet termális, mechanikai, illetve kémiai.

1.2. A nociceptorok fajtái, különös tekintettel a termonociceptorokra

A nociceptorok morfológiai és funkcionális tulajdonságait részletesen tanulmányozták patkányban, egérben, nyúlban, majomban és emberben (Brown és Iggo, 1967; Burgess és Perl, 1967; Bessou és Perl, 1969; Reeh, 1986; Meyer *et al.*, 1991; Leem *et al.*, 1993; Lynn, 1994; Koltzenburg *et al.*, 1997; Cain *et al.*, 2001). Az aktiváló inger fajtája alapján megkülönböztethetők nagy intenzitású mechanikai ingerrel aktiválható **mechanonociceptorok**, forró vagy fájdalmasan hideg ingerrel aktiválható **termonociceptorok** és kémiai ágensekkel aktiválható **kemonociceptorok**. Léteznek velőhüvely nélküli, az akciós potenciált lassan (0,5–1 m/s) vezető, **C nociceptorok** és vékony velőhüvellyel bíró, vastagabb, gyorsabban (2–20 m/s) vezető **A δ nociceptorok**. Az **unimodális nociceptorok** csak egy fajta ingerrel aktiválhatók, ilyenek pl. a magas küszöbű **C** és **A δ mechanonociceptorok**. Jelentős populációt képeznek a – C vagy A δ rostokkal bíró – „**mechano–heat–sensitive**” (**C-MH, A-MH**) **nociceptorok**, amelyek nevüket onnan kapták, hogy erős mechanikai és forró ingerekkel aktiválhatók. Kiderült, hogy ezek számos kémiai ágenssel is működésbe hozhatók, így ezek valójában **polimodális nociceptorok** a három fajta aktiváló ingerük alapján. A polimodális nociceptorok jelentőségét – egyebek mellett (lásd az 1.5. pontban) – egyrészt magas arányuk (a patkány bőrében az összes afferens C rost kb. felét teszik ki) adja, másrészt az a tény, hogy kiemelt szerepük van mind a forró ingerek, mind a kémiai ágensek detektálásában (ugyanis nincs olyan jelentős más csoportja az afferenseknek, amelyik ezen ingerekkel aktiválható). A nociceptív C afferensek speciális csoportját képezik az ún. alvó („**silent**”, „**sleeping**”) nociceptorok, amelyek intakt szövetben nem aktiválhatók mechanikai ingerekkel (egy részük forró ingerrel sem), (C-M_iH, C-M_iH_i rostok), de gyulladásos mediátorok vagy exogén kémiai ágensek hatására aktiválódnak, majd ezt követően mechano- (és termo-) szenzitívvé válnak. Az ún. C melegreceptorok már alacsonyabb, nem fájdalmasan meleg hőmérsékletek hatására aktiválódnak; ezek nem nociceptorok, mert nem képesek kódolni az ingerintenzitást a forró tartományban.

Ember és majom szőrös bőrén végzett analízis alapján a forró ingerrel aktiválható nociceptorok három alcsoportba oszthatók. Az **I-es típusú A-MH rostok** hőküszöbe 53 °C, maximális tüzelési frekvenciájuk elérésének latenciáideje hosszú (21 s). A **II-es típusú A-MH rostok** és a **C-MH rostok** hőküszöbe 46, illetve 41 °C, a maximális tüzelési frekvenciát 1–3 másodpercen belül eléri (Campbell és LaMotte, 1983; Treede *et al.*, 1995). Patkányban és egérben is kimutatták, hogy a C polimodális nociceptorok hőküszöbe szignifikánsan alacsonyabb, mint az A δ típusúaké (Leem *et al.*, 1993; Koltzenburg *et al.*, 1997). Ember végtagjának felszínére irányított fázikus forró (vagy mechanikai) inger érzékelésénél megkülönböztethető az ún. első és második fájdalom (a hivatkozásokat illetően lásd Campbell és

LaMotte, 1983; Treede *et al.*, 1995). Előbbi jelenti a gyorsan vezető, A δ nociceptorok által kiváltott korai érzetet, amelynek jellemzői a rövid latencia és időtartam. Az első fájdalom küszöbe az alkar voláris felszínén 43–45 °C, a kéz hátán 47 °C. A második fájdalom latenciáideje és tartama hosszabb, égő jellegű, és a lassan vezető, velőtlen C nociceptorok aktivációja váltja ki. A hővel kiváltott első fájdalomért a II-es típusú A-MH rostok felelősek; ezek a rostok a szőrtelen bőrterületen hiányoznak, ezzel összhangban itt hiányzik az első fájdalom. A második fájdalom neuronális korrelátumát a C-MH rostok képezik. A forró ingerrel kiváltott ionáramot részletesen vizsgálták primer szenzoros neuronok sejttestén (Cesare és McNaughton, 1996; Kirschstein *et al.*, 1997; Nagy és Rang, 1999a; 1999b). A kis-közepes méretű (potenciálisan nociceptív) neuronok mintegy fele aktiválható forró ingerekkel. Nagy és Rang (1999a) adatai szerint a hőre nem reagáló szenzoros neuronok (43%) kapszaicinre sem reagálnak. A hőérzékeny neuronok 57%-a alacsony aktivációs küszöbű (45 °C), kis-közepes méretű és kapszaicinérzékeny, míg a maradék 43% magas (51 °C) aktivációs küszöbű, nagy méretű és kapszaicinre nem reagáló. Általánosan elfogadott, hogy az alacsony küszöbű neuronok C-MH és II-es típusú A-MH rostokat adnak, hőválaszuk a TRPV1-csatorna (lásd 1.4.1. pont) révén jön létre, míg a magas küszöbű neuronok I-es típusú A-MH rostokkal rendelkeznek és a hőválaszuk TRPV2-függő (lásd 1.4.2. pont).

Neurokémiai alapon a C polimodális nociceptorok két alcsoportba oszthatók (Nagy és Hunt, 1982; a további referenciákat illetően lásd Stucky és Lewin, 1999; Dirajlal *et al.*, 2003). Az egyik alpopuláció neuronjainak kifejlődéséhez és normális működéséhez idegnövekedési faktor („nerve growth factor”, NGF) szükséges, jelentős mennyiségben tartalmaznak neuropeptideket (pl. substance P [SP], neurokinin A és B [NKA, NKB], calcitonin-gén-rokon peptid [CGRP], szomatosztatin [SOM], „pituitary adenylate cyclase activating peptide”). A másik alcsoportba tartozó nociceptorok fejlődéséhez és adekvát működéséhez „glial cell line-derived neurotrophic factor” szükséges, peptidtartalmuk minimális, és membránjukban található egy szénhidrátcsoporthoz, amely képes kötni egy növényi lektint, az izolektin-B₄-et (IB₄). Mind az IB₄-negatív (**peptiderg**), mind az IB₄-pozitív (praktikusan **nem-peptiderg**) nociceptív neuronok tartalmaznak glutamátot, mint neurotranszmittert, és aktiválhatók forró ingerekkel. A peptiderg nociceptorok különleges funkciókkal rendelkeznek (a részleteket lásd az 1.5 pontban).

A fájdalmas hideggel aktiválható nociceptorok két fő csoportját a „**mechano-cold-sensitive**” A δ és C nociceptorok (**A-MC** és **C-MC**), valamint azok a polimodális nociceptorok képezik, amelyek – a fent említett ingerek mellett – fájdalmas hideggel is aktiválhatók (**C-MHC** és **A-MHC**; Burgess és Perl, 1967; Bessou és Perl, 1969; Cain *et al.*, 2001; Leem *et al.*, 1993; Campero *et al.*, 1996; Simone és Kajander, 1996). A fájdalmas hidegre érzékeny A δ rostok

küszöbe a 0 – -12 °C-os tartományban van, a C rostoké a 12 – -6 °C-osban. A primer szenzoros neuronokban nem fájdalmas intenzitású (16–18 °C-ig terjedő) hidegingerrel kiváltott ionáramot azonosítottak, amely mentollal is aktiválható volt, és közvetítője a TRPM8-csatorna (lásd 1.4.7. pont, Reid *et al.*, 2002). Erősebb hűtés kapcsán (12 °C-ig) egy alacsonyabb küszöbű áramot is azonosítottak mentol-érzékeny neuronokban; ennek ioncsatorna-háttérrel nem tisztázott (Babes *et al.*, 2004).

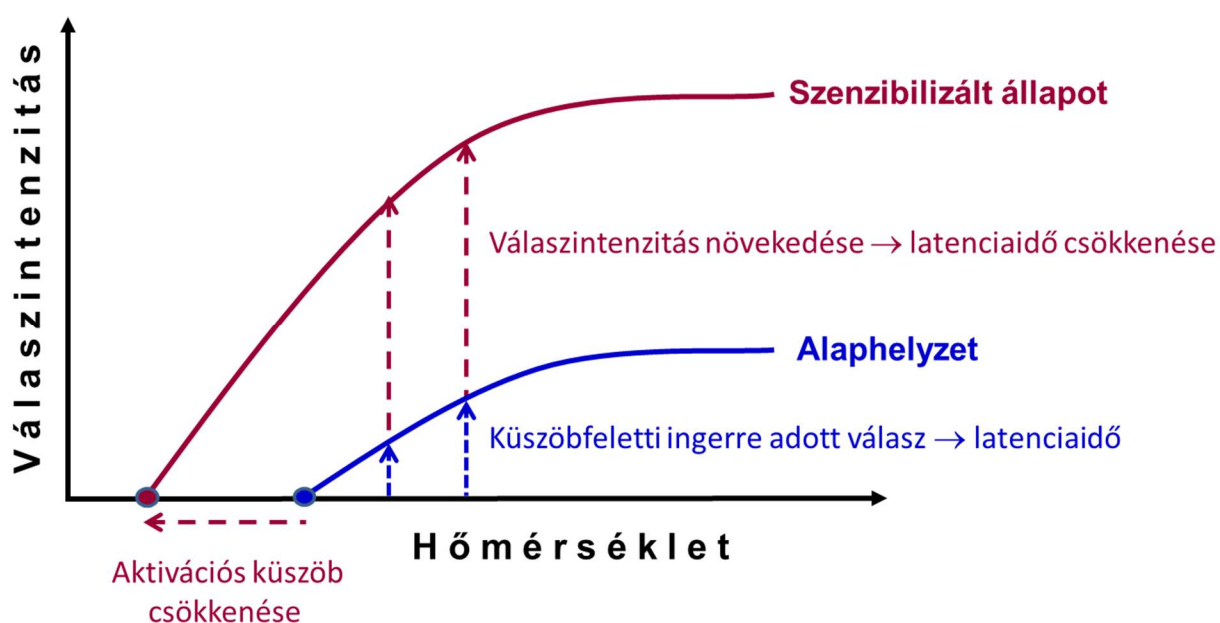
1.3. A termonocicepció vizsgálómódszerei

1.3.1. A termonocicepció vizsgálómódszereinek elméleti háttere

Az alábbiakban csak a forró ingerrel kiváltott nocicepció/fájdalom mérésére alkalmas módszereket tárgyaljuk. A tágabb értelemben vett termonocicepció vizsgálatára számos módszer ismert. Lehetőség van forró ingerrel kiváltott membrán-ionáramok, Ca^{2+} -akkumuláció formájában történő idegi aktiváció mérésére szenzoros neuronok sejttestén *in vitro*. Klasszikus módszer az idegi aktivitás (akciós potenciál) elvezetése nociceptív szenzoros rostokról (egyrost-elvezetés) *in vitro* vagy *in vivo*. A peptiderg nociceptorok aktivációja követhető a neuropeptid-felszabadulás mérésével, szintén *in vitro* vagy *in vivo*. Szintén klasszikus eljárás a nociceptív magatartási tesztek végzése éber állatokon, amely során hőingerekkel kiváltott nocifenzív (fájdalomelkerülő) reakciókat vizsgálnak különféle elrendezésekben. Érdekesség, hogy a hővel kiváltott fájdalomreakciót legelőször Hardy és munkatársai (1940) emberben vizsgálták, majd Ercoli és Lewis 1945-ben patkányokban (Ercoli és Lewis, 1945). Ezekben a korai kísérletekben lámpa sugárzó hőjét irányították az emberi alkarra, illetve patkányok hátára, majd a fájdalomérzet jelentkezéséig, illetve az elkerülő reakcióig eltelt időt mérték.

A termonocicepció vizsgálatára használatos módszerek elméleti hátterét az **1. ábra** mutatja. Az alkalmazott termális inger intenzitása (praktikusan a hőmérséklet) és a kiváltott válasz nagysága közötti összefüggés egy hipotetikus függvénnyel (kék vonal) írható le. E függvény jellegzetes pontja az **aktivációs küszöb**, vagyis az a legalacsonyabb (forró) hőmérséklet, amelyik választ képes kiváltani. Válasz alatt a kísérleti paradigmától függően érthetünk ionáramot, akciós potenciált vagy nocifenzív magatartási reakciót. Értelemszerűen minden küszöbfeletti hőmérsékletre tartozik a válaszreakció egy adott nagysága. Az állatkísérletes magatartási vizsgálatokban típusosan mért **latenciaidő** (az elkerülő, nocifenzív reakció kiváltásáig eltelt idő) a válaszintenzitás által valamilyen módon meghatározott, indirekt paramétere a függvénynek. A nocifenzív reakció bekövetkeztéig eltelt idő mérése technikailag sokkal egyszerűbb, mint a küszöbhőmérséklet valós idejű mérése, ráadásul a nocifenzív reakció bekövetkeztének megállapítása könnyen automatizálható (pl. fénykapu segítségével), ami

érthetővé teszi a latenciaidő-mérési módszerek kiterjedt gyógyszerügyi alkalmazását az analgetikumok preklinikai tesztelése során. Amennyiben a hőérzékeny nociceptorok érzékenyítődése jön létre (termális nociceptor-szenzibilizáció, illetve az egész szervezet szintjén termális hiperalgéria/allodynia), a függvény képe karakterisztikusan megváltozik (bordó vonal). Típusos esetben az aktivációs küszöb lecsökken, azaz alacsonyabb hőmérséklet is képes válasz kiváltására, mint ami alaphelyzetben szükséges volt ehhez, illetve a küszöbfeletti ingerek nagyobb válaszokat váltanak ki, ezáltal lecsökken a latenciaidő; mindezek következményeként a görbe balra tolódik, és függőleges irányban megnyúlik.



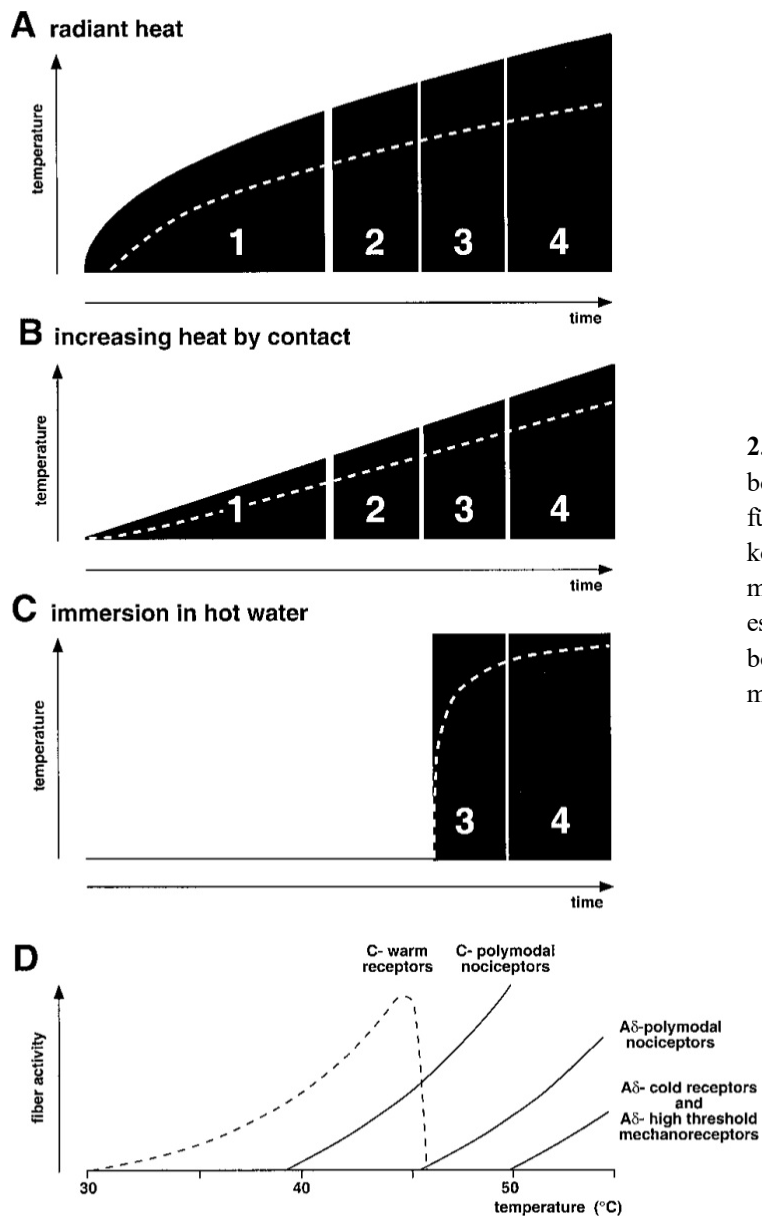
1. ábra. Hipotetikus ingerintenzitás-hatás összefüggés a nociceptorok termális aktivációjára és annak szenzibilizációjára vonatkozóan. A részleteket lásd a szövegben.

1.3.2. Latenciaidő-mérésen alapuló állatkísérletes magatartási tesztek a termonocicepció vizsgálatára

Ezeknél a módszereknél küszöbfeletti intenzitású hőingert irányítanak az állat adott testrészére (típusosan farok, végtagok), és az elkerülő, nocifenzív reakció bekövetkeztéig eltelt latenciaidőt mérik (**1. ábra**). Lézeres hőstimulátor – amely kevesebb mint 250 ms alatt növeli a hőmérsékletet a beállított értékre – alkalmazásával kimutatták, hogy minél magasabb az ingerlési hőmérséklet a 40–51 °C-os tartományban, annál rövidebb a fájdalomérzet kialakulásának latenciaideje (Campbell és LaMotte, 1983).

Standard módszer a „**tail-flick**” **teszt**, amelynek során sugárzó hőt irányítanak a kézben tartott vagy más módon mozgásában akadályozott állat (patkány, egér) farkára, és a farok elrántásáig eltelt időt mérik (D’Amour és Smith, 1941; Smith *et al.*, 1943). Fontos, hogy a

sugárzó hő hatására viszonylag lassan, az idő négyzetgyökével arányosan nő a besugárzott bőr hőmérséklete (**2. ábra, A panel**; Buettner, 1951). Emiatt van idő arra, hogy először a C típusú melegreceptorok aktiválódjanak átmeneti jelleggel, majd ezzel átfedésben a C polimodális nociceptorok, ez utóbbiakkal átfedésben az A δ polimodális nociceptorok, végül a polimodális nociceptorok mellett paradox módon az – amúgy nem fájdalmas hidegre érzékeny – A δ hidegreceptorok és az A δ magas küszöbű mechanonociceptorok (**2. ábra, D panel**). A „tail-flick” reakció spinális reflex eredménye (Irwin *et al.*, 1951; Bonnycastle *et al.*, 1953; Sinclair *et al.*, 1988). A latenciaidő függ a farok bőrének – dominánsan a farok perfúziója és az aktuális környezeti hőmérséklet által meghatározott – kiindulási hőmérsékletétől: alacsonyabb bőrhőmérséklet hosszabb latenciaidőt eredményez és fordítva (Berge *et al.*, 1988;



2. ábra (Le Bars *et al.*, 2001). A bőrhőmérséklet alakulása az idő függvényében sugárzó hővel (**A panel**), kontakt hővel (**B panel**), illetve forró vízbe merítéssel (**C panel**) történő hőstimuláció esetén. A **D panel** a különböző rostfajták bőrhőmérséklet-aktivitás összefüggését mutatja.

Eide és Tjolsen, 1988). Hangsúlyozandó, hogy a fark fontos szerepet játszik a patkány és egér hőszabályozásában, emiatt a farkbőr hőmérséklete jelentősen ingadozhat, még termoneutrális környezetben is jelentős fluktuáció detektálható (El Bitar *et al.*, 2014). Egyes analgetikumok, pl. a morfin vazokonstriktort okoz a farkban, ami a latenciaidő megnyúlását eredményezi, zavart okozva a szer termális antinociceptív hatásának megítélésében (El Bitar *et al.*, 2016). Emberben is kimutatták, hogy a bőrhőmérséklet emelkedése lecsökkenti a sugárzó hővel kiváltott fájdalomérzet latenciáidejét, ellenben a termális fájdalomküszöb változatlan marad (Pertovaara *et al.*, 1996). Az aktuális környezeti hőmérséklet jelentős latenciaidő-befolyásoló hatását újabb, korszerű metodikát alkalmazó vizsgálatok is megerősítették mind patkányban, mind egérben (Benoist *et al.*, 2008; Pinedé *et al.*, 2012). Kimutatták azt is, hogy a latenciaidő függ a bőrterület pigmentációjától, a sugárzás intenzitásától, a stimulált bőrfelület nagyságától, valamint a stimuláció farkon belüli pozíciójától (Winder *et al.*, 1946; Carroll, 1959; Kawakita és Funakoshi, 1987; Ness *et al.*, 1987). A „tail-flick” teszt további hátránya, hogy ismételt kiváltása esetén habituációt (latenciaidő-megnyúlást) mutat, amelynek mértéke nagyobb, ha erősebb ingert és kisebb időközzel ismételnék (Groves és Thompson, 1970; Carstens és Wilson, 1993). Analgetikus hatású szerek vizsgálata során szükséges egy ún. „cut-off” (maximális besugárzási) idő beállítása a szöveti károsodás elkerülése érdekében. A „tail-flick” módszerrel az erős ópioid agonisták hatását megbízhatóan lehet mérni, a gyenge agonisták és a nem-szteroid gyulladásgátló analgetikumok (NSAID-ok) vizsgálata problematikus (a részleteket illetően lásd Le Bars *et al.*, 2001).

A „tail-flick” teszt egyik variánsa, amikor a kézben tartott egér vagy patkány farkát konstans hőmérsékletű forró vízbe mártják, és a fark kirántásáig eltelt latenciaidőt mérik (**„tail immersion”** vagy **farokbemerítéses teszt**, Ben-Bassat *et al.*, 1959). Ebben az esetben nagy területet ér a hőinger, és gyorsan emelkedik a bőr hőmérséklete, emiatt a választ az A δ polimodális nociceptorok és – paradox módon – az A δ hidegreceptorok, illetve A δ magas küszöbű mechanonociceptorok aktivációja dominálja (**2. ábra, C és D panel**). Lehetőség van különböző hőmérsékletű (típusosan 48–56 °C) vízfürdők alkalmazására, amelyek értelemszerűen eltérő latenciaidőket eredményeznek: alacsonyabb hőmérsékletnél hosszabb a latenciaidő és fordítva. Alacsonyabb vízhőmérséklet alkalmazása növeli az érzékenységet a kisebb hatékonyságú analgetikumok (gyenge ópioid agonisták, NSAD-ok) iránt (Sewell és Spencer, 1976; Luttinger, 1985). Egy másik variáns esetében az egyik hátsó végtagot merítik állandó hőmérsékletű forró vízbe (**„paw immersion”** vagy **lábbemerítéses teszt**).

A Hargreaves-féle **„paw withdrawal”** vagy **„plantar” teszt (plantárteszt)** elvében hasonló a „tail-flick” teszthez, de ebben az esetben az átlátszó plexilapon szabadon mozgó

patkány vagy egér talpára irányítanak hőszugárzást, és a láb elemeléséig eltelt időt mérik (Hargreaves *et al.*, 1988). Előnye, hogy a termoregulációban fontos szerepet játszó fark helyett a hátsó végtag reakcióját méri. Mindazonáltal patkányban kimutatták, hogy a kiindulási bőrhőmérséklet – ami függ az aktuális környezeti hőmérséklettől – ennél a tesztnél is befolyásolja a latenciaidőt, és még termoneutrális környezetben is jelentős periodikus fluktuáció mutatható ki a hátsó végtag bőrének hőmérsékletében (El Bitar *et al.*, 2014; Vítková *et al.*, 2015). A környezeti hőmérséklet csekély, 2–4 °C-os változása már szignifikáns eltérést eredményez a latenciaidőben (nemcsak a hátsó végtagon, hanem a mellső végtagon és a farkon is). A módszer további hátránya, hogy az állat talpa nem mindig egyforma mértékben simul hozzá az aljzathoz.

A „**hot plate**” (forró lap) teszt (Woolfe és Mac-Donald, 1944) esetében az egér vagy patkány szabadon mozog egy fémfelületen, amelynek hőmérsékletét állandó értéken (48–56 °C) tartják; gyakran használt hőmérséklet az 52 vagy 55 °C. A típusos nocifenzív reakció valamelyik végtag nyalása, illetve az állat ugrása, de egyéb magatartásformák is előfordulhatnak. Ezek a reakciók szupraspinálisan integrálódó magatartásformák. A teszt esetében valószínűsíthető, hogy a bőrhőmérséklet ugyanúgy lineárisan változik az idővel, mint a termód (lásd 1.3.4. pont) esetében. A teszt ismétlésekor tanulási folyamat figyelhető meg, ami a latenciaidő rövidüléséhez vezet (Knoll *et al.*, 1955). A módszer esetében jelentős a kiindulási (kontroll) latenciaidő állatcsoportok közötti variabilitása, ami abban nyilvánul meg, hogy ugyanazon laboratóriumban különböző vizsgálatok keretében végzett mérések eltérő latenciaidőket mutatnak (Vierck és Cooper, 1984). A forró lap módszerrel elsősorban a nagy hatékonyságú ópioid agonisták hatását lehet megbízhatóan mérni, a gyenge agonisták és az NSAID szerek vizsgálata nehézkes (Le Bars *et al.*, 2001). Ez utóbbiaknál 50 °C-nál alacsonyabb laphőmérséklet alkalmazása elősegítheti az antinociceptív hatás kimutatását (Ankier, 1974).

Általánosan elfogadott, hogy az állatkísérletekben típusosan használt, latenciaidőmérésen alapuló termonociceptív tesztek esetében alaphelyzetben a nocifenzív reakciót A δ nociceptorok által szállított impulzusok váltják ki. Más azonban a helyzet gyulladásos hiperalgégia esetében, mivel a képződő mediátorok hatására a C polimodális nociceptorok nagyobb mértékben képesek szenzibilizálódni a hőingerekkel szemben, mint az A δ nociceptorok (ennek részeként hőküszöbük lecsökken), és a számuk is nagyobb, mint az A δ rostoké. Ezen túlmenően az alvó („silent”) C nociceptorok (C-M α H β) is aktiválódnak gyulladásos környezetben. Mindez azt jelenti, hogy gyulladás esetén a jelentős mértékben szenzibilizálódott C rostok alacsony hőküszöbük miatt a kisebb vezetési sebességük ellenére hamarabb bejuttatják az információt a központi idegrendszerbe, és ezáltal aktivációjuk felelős a nocifenzív reakció kiváltásáért.

1.3.3. A latenciaidő-mérésen alapuló termonociceptív magatartási tesztek hátrányai

A termonocicepció latenciaidő-mérésen alapuló állatkísérletes vizsgálatának – elterjedtsége ellenére – számos hátránya van. Attól függően, hogy milyen intenzitású forró ingert alkalmaznak, változik a latenciaidő. A forró lap, farok- és lábbemerítéses tesztek esetében az alkalmazott küszöbfeletti ingerintenzitás °C-ban egzakt módon megadható, de a sugárzó hőt alkalmazó „tail-flick” és a plantárteszt esetében ez többnyire csak indirekt módon (energia formájában vagy relatív skála segítségével) jellemezhető. Ez utóbbi tesztek esetében a módszernek más készülékre való „transzportálhatósága” rendkívül problémás, ami megnehezítheti vagy akár lehetetlenné teheti a különböző ingerintenzitásokra beállított készülékekkel nyert eredmények összevetését. A latenciaidő függ az ingerelt testrész(ek) bőrének a teszt végzésének idején fennálló aktuális hőmérsékletétől, ami viszont a bőr perfúziója által meghatározott (lásd 1.3.2. pont). A latenciaidő nem vethető össze az *in vivo* vagy *in vitro* elektrofiziológiai kísérletekben, főleg az egyrost-elvezetést, illetve a „patch-clamp” technikát alkalmazókban rutinszerűen meghatározott aktivációs küszöbvel, vagyis azzal a legalacsonyabb forró hőmérséklettel, amely a nociceptív rost receptív területére alkalmazva akciós potenciál(oka)t, illetve a „patch-clamp” kísérletben ionáramot vált ki. Hasonlóképpen humán vizsgálatokban is a hőküszöböt, a termális fájdalomküszöböt mérik, amely megint csak nem vethető össze a latenciaidővel. A latenciamérés elvéből következően ezzel a módszerrel a klinikailag releváns termális allodynia nem vizsgálható, hiszen ez utóbbi *per definitionem* a hőküszöb csökkenését jelenti, míg a latenciaidő mérése mindig küszöbfeletti ingerrel történik.

Megjegyzendő, hogy a mechanonocicepció vizsgálatában alkalmazott standard állatkísérletes módszerek (von Frey filamentumok, Randall–Selitto-módszer) esetében is az aktivációs küszöböt (azt a legkisebb erőt, amely nocicenzív reakciót vált ki) határozzák meg.

1.3.4. A termális fájdalomküszöb mérésén alapuló magatartási tesztek

Ezeknél a módszereknél nem-fájdalmas (küszöb alatti) kiindulási hőmérsékletről indulva fokozatosan növekvő intenzitású (emelkedő hőmérsékletű) hőingert irányítanak az ember (vagy állat) adott testrészére, és azt a legalacsonyabb forró hőmérsékletet határozzák meg, amelynél emberben fájdalomérzet jelentkezik (**termális fájdalomküszöb**), illetve állatban bekövetkezik az elkerülő, nocifenzív reakció (**nociceptív hőküszöb**, lásd 1. ábra). A termális fájdalomküszöb mérése emberben már régóta alkalmazott módszer a pszichofizikai és elektrofiziológiai vizsgálatokban egyaránt (Hardy *et al.*, 1950; Meyer és Campbell, 1981; LaMotte *et al.*, 1982; Sycha *et al.*, 2003). Típusosan emberben alkalmazott módszer a kontakthő használata, amikor termódot (Peltier-elemet) helyeznek a bőrre (Kenshalo és Bergen, 1975; Fruhstorfer *et al.*, 1976),

aminek hatására a bőrhőmérséklet közel lineárisan nő az idővel (**2. ábra, B panel**). Ilyen esetben a különböző termoszenzitív rostfajták ugyanolyan sorrendben aktiválódnak, mint a sugárzó hő esetében (lásd 1.3.2. pont). A termód hátránya, hogy mechanikai ingerlést is okoz, ami szegmentális antinociceptív hatást kiváltva torzíthatja az eredményt. A Peltier-elem segítségével lépcsőzetesen vagy folyamatosan lehet növelni a bőrhőmérsékletet, ami lehetővé teszi a °C-ban megadott termális fájdalomküszöb meghatározását.

Emberben kimutatták, hogy fokozatosan emelkedő intenzitású („ramp-like”) hőinger alkalmazása esetén a bőrhőmérséklet közel lineárisan növekszik. A melegítési sebesség növelésének három jellegzetes következménye van. (i) Gyorsabb ütemű hőstimuláció esetében a termális fájdalomküszöb elméletileg alacsonyabb, hiszen gyorsabb hőmérséklet-emelkedés esetében a nociceptorok tüzelési frekvenciája nagyobb (Yarnitsky és Ochoa 1990; Yarnitsky *et al.*, 1992; Tillman *et al.*, 1995a), ezáltal a fájdalomérzet kiváltásához szükséges küszöbfrekvenciát hamarabb lehet elérni. Hangsúlyozandó, hogy alacsony frekvenciájú nociceptor-kisülések nem eredményeznek termális fájdalomérzetet (Van Hees és Gybels, 1981; Bromm *et al.*, 1984). Tehát a fájdalom percepciójához temporális szummációra van szükség, azaz egy bizonyos minimális frekvenciájú aktivitás kell a termonociceptorokban ahhoz, hogy fájdalomérzet jöjjön létre. (ii) A magatartási vizsgálatok esetében figyelembe kell venni a **reakcióidőt** is, amely magába foglalja az impulzusok központi idegrendszerbe való terjedésének, a centrális feldolgozásnak és az efferenciának az időszükségletét. A valódi fájdalomküszöb elérésekor még nem ad a reakciót a vizsgálati alany, hiszen a perifériás nociceptorban kiváltott impulzusnak be kell jutnia az agyba, és feldolgozása után ki kell váltania a szükséges magatartási reakciót (kar vagy gomb lenyomása). Mire mindez lezajlik, a bőrhőmérséklet – a melegítési ütemmel arányosan – már „túlfut”, azaz az igazi fájdalomküszöbnél magasabb lesz. Tehát egy mérési artefakt lép fel, amelynek nagysága annál nagyobb, minél nagyobb a melegítés ütem. (iii) Gyorsabb ütemű melegítés esetén a bőr mélyebb rétegeiben, ahol a nociceptorok találhatóak (epidermis alsó része, dermis), alacsonyabb a hőmérséklet, mint a felszínen (Tillmann *et al.*, 1995b). Ennek oka a **szövetek termális tehetetlensége**, amely miatt a rétegek közötti hőmérsékleti kiegyenlítődés elhúzódik, a mélyebb rétegek hőmérséklete „késik” a felszínéhez viszonyítva. Lassabb fűtés esetén ugyanakkor több idő áll rendelkezésre a kiegyenlítődésre, ezáltal kisebb a „késés”. A bőrön belüli hőmérsékleteloszlást modellezve sikerült igazolni, hogy minél magasabb a melegítési ráta, annál inkább elmarad a mélyebb rétegekben mért hőmérséklet a felszínihez képest. Ezzel a mechanizmussal magyarázható, hogy gyorsabb ütemű melegítés esetén a bőrfelszínen mérve az egyes C polimodális nociceptorok aktivációs küszöbe magasabbnak bizonyult (39,6-ről 41,7 °C-ra nőtt), mint lassabb melegítéskor (Tillman *et al.*,

1995a; 1995b). Hasonló küszöbemelkedést eredményezett – lépésenként emelt stimulációs hőmérséklet esetén – a hőinger tartamának, illetve a kiindulási bőrhőmérsékletnek a csökkentése. E két utóbbi változás is jól magyarázható a szövetek termális inerciájával. A három tényező együttes hatása szabja meg egy adott kísérleti paradigmában, hogy a melegítési ütem növelésével változik-e a termális fájdalomküszöb, és ha igen, melyik irányba.

Patkány hátsó lábának lábháti részére irányított sugárzó hőingerrel kapcsolatban kimutatták, hogy állandó intenzitású stimuláció esetén a bőrhőmérséklet az idő logaritmusával arányosan nőtt, a subcutis hőmérséklete viszont lineárisan emelkedett (Yeomans és Proudfit, 1994). Az ingerlési intenzitás növelésével az átlagos fűtési sebesség a 0,9–6,5 °C/s tartományban változott. Kimutatták, hogy lassabb ütemű melegítés (0,9 °C/s) esetén hosszabb a latenciaidő, alacsonyabb a bőrhőmérséklet, és csak C polimodális nociceptorok aktiválódnak, ellenben ha nagyobb intenzitású sugárzással gyors ütemben (6,5 °C/s) növelik a lábhat bőrnek hőmérsékletét, a latenciaidő lerövidül, a bőr hőmérséklete magas lesz, ezért mind az A δ , mind a C polimodális nociceptorok aktiválódnak (Yeomans és Proudfit, 1994; Yeomans és Proudfit, 1996; Yeomans *et al.*, 1996). Ha lassabb a melegítés, azon idő alatt, amíg a hőmérséklet a C rostok küszöbéről az A δ rostok – kb. 5 °C-kal magasabb – küszöbéig nő, a C rostok aktiválódása kiválthatja a válaszreakciót, vagyis csak a C rostok közvetítik a hőválaszt anélkül, hogy az A δ rostok aktiválódnának. Ellenben gyorsabb melegítés esetében olyan hamar emelkedik a hőmérséklet a C rostok küszöbéről az A δ rostokéra, hogy utóbbiak gyorsabb vezetési sebességük miatt hamarabb juttatják az információt a központi idegrendszerbe, mint a C rostok: a nocifenzív reakció kiváltásáért az A δ nociceptorok felelősek.

1.3.5. Korábbi próbálkozások a nociceptív hőküszöb mérésére állatban

Kísérleti állat nociceptív hőküszöbének mérésére tett első dokumentált próbálkozás Oden és Oden nevéhez fűződik (1982), akik egy **emelkedő hőmérsékletű forró lapot** fejlesztettek ki, amelynek a hőmérsékletét egyenletesen tudták növelni különböző (2 °C/perc és 1 °C/s között) sebességgel mindaddig, amíg a patkány nocifenzív reakciót (valamelyik végtag megnyalása) nem mutatott. Az ekkor mért láb hőmérsékletet tekintették nociceptív hőküszöbnek. Egy speciális titrálós módszer alkalmazva a nociceptív hőküszöböt 41,5 °C körüli értéknek találták, és 6 mg/kg i.p. adott morfin hőküszöbemelő hatását mutatták ki patkányban. Ezzel a módszerrel végzett további kísérletekről nincs adat a szakirodalomban.

A másik korai próbálkozás Szolcsányi (1985; 1987b) nevéhez fűződik, aki egy **emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt** alkalmazott. Kísérletei során éber patkány egyik hátsó lábát állandó hőmérsékletű vízfürdőbe mártotta oly módon, hogy a vízfürdő hőmérsékletét 1 °C-os lépésekben

növelte mindaddig, amíg az állat a lábát ki nem rántotta a vízből. Ezzel a módszerrel közelítőleg tudta mérni a láb nociceptív hőküszöbét, vagyis azt a legalacsonyabb forró hőmérsékletet, amely a hátsó lábon elhárító, nocifenzív reakciót okoz: az állatok 50%-ában reakciót kiváltó hőmérséklet interpolációval 46,5 °C-nak adódott. Ezen új megközelítéssel lehetővé vált egyrészt 100 mg/kg aszpirin hőküszöbemelő hatásának kimutatása, másrészt a markáns deszenzibilizációt (lásd 1.4.1.5. pont) kiváltó magas dózisú kapszaicin dózisfüggő termális antinociceptív hatásának demonstrálása (Szolcsányi, 1985; 1987b). Ez utóbbi a hagyományos, latenciaidő-méréseken alapuló módszerekkel korábban nem sikerült egyértelműen.

Hole és munkatársai egy **számítógép-vezérelt emelkedő hőmérsékletű forró lapot** fejlesztettek ki, amelynek a hőmérsékletét egyenletesen tudták növelni 42 °C-ról 1–6 °C/perc sebességgel mindaddig, amíg a patkány vagy egér nocifenzív reakciót (típusosan valamelyik hátsó végtag megnyalása) nem mutatott (Hunskar *et al.*, 1986; Tjolsen *et al.*, 1991). Az ekkor mért laphőmérsékletet tekintették nociceptív hőküszöbnek. A fűtési sebességtől függően a nociceptív hőküszöb a 44 és 46 °C közötti tartományban volt mind patkányban, mind egérben (a gyorsabb fűtés magasabb küszöböt eredményezett). Ezzel a készülékkel az i.p. adott morfin (4 és 8 mg/kg) és paracetamol (200 és 400 mg/kg) hőküszöbemelő hatását tudták kimutatni patkányban és egérben egyaránt. Néhány további, szerotonerg ligandum hatásait leíró publikáció megjelenése után ez a metodikai megközelítés is „kihalt”.

Szintén tiszavirágéletű (egyetlen közleményt eredményező) próbálkozás volt a farokbemerítéses teszt módosítása a nociceptív hőküszöb mérésére (Farré *et al.*, 1989). A **„maximum tolerated temperature of the rat tail”** mérése során a kézben tartott patkány farkát vízfürdőbe mártották, amelynek hőmérsékletét 37 °C-ról 2,1 °C/perc ütemben növelték a farok kirántásáig. Ezzel a módszerrel a küszöbhőmérséklet 46,2 °C-nak adódott. A módszerrel sikerült kimutatni nemcsak ópoidok (morfin: 2,5–5 mg/kg), hanem egyes NSAID-ok, köztük az aszpirin (320–640 mg/kg) hőküszöbemelő hatását i.p. injekciót követően.

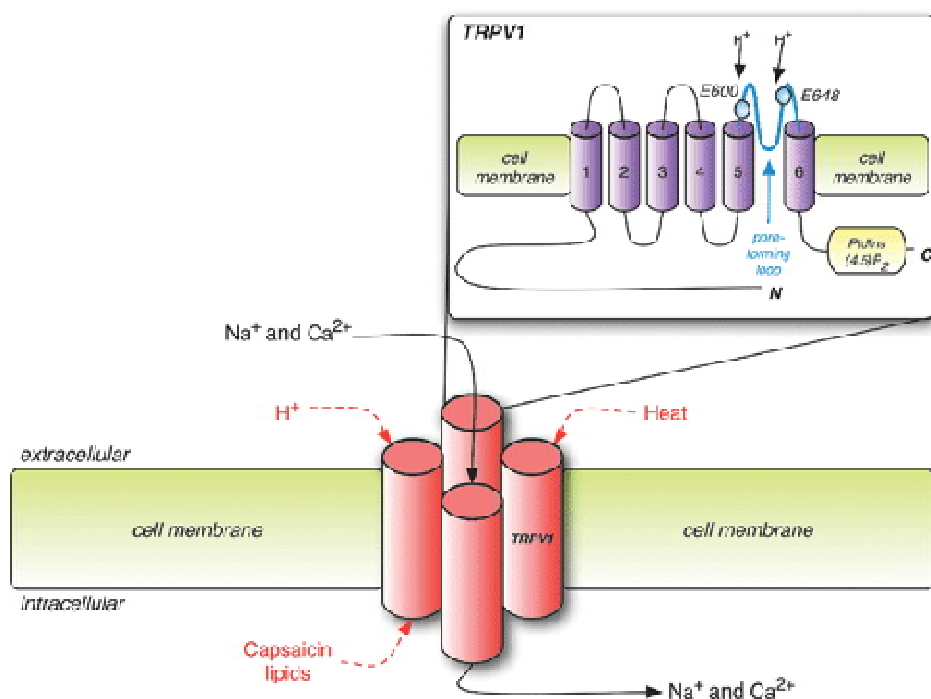
1.4. A termális ingerekkel aktiválható ioncsatornák

1.4.1. TRPV1

1.4.1.1. A TRPV1-receptor általános jellemzői

A csípős paprikában található kapszaicin régóta ismert irritáns, amely a bőrre vagy nyálkahártyára adva intenzív, égő fájdalmat képes kiváltani. A kapszaicin hatása nagymértékben szelektív a C és A δ polimodális nociceptorokra (Szolcsányi, 1987a; 1987b; Szolcsányi *et al.*, 1988; LaMotte *et al.*, 1992). Ezenkívül főemlősökben a kapszaicin képes aktiválni az ún. „alvó” C nociceptorokat (C-M α H, C-M β H γ) is (Schmelz *et al.*, 2000). Kapszaicinanalógok szerkezet-

hatás összefüggésének vizsgálata alapján Szolcsányi már 1975-ben felvetette, hogy a kapszaicin specifikus farmakológiai receptor aktiválása révén hat (Szolcsányi és Jancsó-Gábor, 1975).



3. ábra. A TRPV1-receptor szerkezete.

Ezt a feltételezett receptort 1997-ben klónozták (Caterina *et al.*, 1997). Először „Vanilloid Receptor-1”-nek (VR1) nevezték (a kapszaicin vanilloid struktúrája alapján), később átkeresztelték a „Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid-1” névre (TRPV1). E receptor (3. ábra) 6 transzmembrán doménből épül fel (a humán ortológ 839 aminosavból áll), aktivációjakor megnyílik az a kationcsatorna, amelyet négy TRPV1-fehérjelánc képez homotetramer formációban (a TRPV1-re vonatkozó referenciákat illetően lásd Szolcsányi és Pintér, 2013; Nilius és Szállási, 2014; Mickle *et al.*, 2015). A nem-szelektív kationcsatorna leginkább Ca^{2+} -ra permeábilis, kisebb mértékben Na^+ és K^+ ionokat is átenged. Az aktivációjakor fellépő domináns, befelé irányuló Na^+ és Ca^{2+} ionáram a membrán depolarizációját váltja ki. A TRPV1 a kapszaicinen kívül számos más növényi eredetű irritánsal (resiniferatoxin [RTX], olvanil, piperin, gingerol, zingeron, kámfor, allicin), alacsony extracelluláris pH-val (5 és 6 között), valamint speciális módon fizikai ingerrel, $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nál magasabb hőmérséklettel is aktiválható. A többnyire lipidoldékony kémiai aktivátorok zöme a sejtmembránon áthaladva a receptort az intracelluláris oldal felől aktiválja, míg a protonok támadáspontja extracelluláris. Ma már ismert, hogy a peptidlánc mely aminosavai felelősek az agonisták, az alacsony pH és a hő hatásáért (a részleteket illetően lásd Szolcsányi és Sándor, 2012). Ezen túlmenően kimutatták, hogy a TRPV1-et képes közvetlenül aktiválni számos zsírsavszármazék, mint az *N*-arachidonil-etanolamid (más néven anandamid, ami a kannabinoid CB_1 receptor endogén liganduma), *N*-

arachidonil-dopamin, *N*-oleoil-dopamin, *N*-oleoil-etanolamin, egyes lipoxigenáz-termékek (pl. leukotrién B₄), valamint az etanol és a propofol is. Egyes gyulladásos mediátorok, mint pl. a bradikinin, PGE₂, szerotonin, ATP, NGF ugyan nem kötődnek TRPV1-hez, azonban saját receptoruk izgatásával olyan jelátviteli folyamatokat indítanak el, amelyek a TRPV1 foszforilációjához és ezáltal annak szenzibilizációjához/aktivációjához vezetnek. Mindezek alapján a TRPV1 nagyszámú exogén és endogén fájdalomkeltő kémiai ágens, valamint a forró ingerek egyfajta molekuláris integrátorának tekinthető.

A TRPV1 expresszióját kis és közepes méretű, azaz nociceptív neuronokban mutatták ki hátsógyökér-ganglionokban („dorsal root ganglia”, DRG), valamint trigeminális és szenzoros vagális ganglionokban. E neuronok C és A δ rostokat képeznek. A TRPV1 a polimodális nociceptoroknak mind a peptiderg, mind a nem-peptiderg alcsoportjában kifejeződik. A TRPV1 megtalálható a gerincvelő hátsó szarvában (elsősorban a nociceptív afferensek centrális terminálisain), az agytörzsben és a hypothalamusban is. Van bizonyíték a TRPV1 expressziójára nem-neuronális sejtekben (keratinocyták, érfal, húgyhólyag stb.) is.

1.4.1.2. A TRPV1-receptor foszforilációs státuszának szerepe a receptor válaszkészségének meghatározásában

A TRPV1-receptor agonisták iránti érzékenységeinek szabályozásában lényeges szerepet játszik a receptorfehérje foszforilációja, ami érzékenyíti a receptort, míg a defoszforiláció deszenzibilizáló hatású. TRPV1-gyel transzfektált nem-neuronális sejtekben, illetve patkány és egér primer afferens neuronjaiban számos gyulladásos mediátor (bradikinin, szerotonin, ATP, IL-1 β) képes a protein-kináz C (PKC) aktiválása révén foszforilálni és így érzékenyíteni a TRPV1-et (Cesare és McNaughton, 1996; Cesare *et al.*, 1999; Premkumar és Ahern, 2000; Vellani *et al.*, 2001; Tominaga *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Sugiura *et al.*, 2002, 2004; Crandall *et al.*, 2002; Numazaki *et al.*, 2002; Obreja *et al.*, 2002; Bhave *et al.*, 2003; Premkumar *et al.*, 2004; Amadesi *et al.*, 2004; Mandadi *et al.*, 2004). Hasonlóképpen szenzibilizáló hatásúak *in vitro* a prosztaglandinok, a forskolin, szerotonin, anandamid és glutamát a protein-kináz A (PKA) aktiválása révén (Hingtgen *et al.*, 1995; Lopshire és Nicol, 1998; De Petrocellis *et al.*, 2001; Rathee *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2002; Bhave *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2003; Mohapatra és Nau, 2003; 2005; Sugiura *et al.*, 2004). Újabb adatok szerint a kalcium-kalmodulin-kináz II is képes foszforiláció révén érzékenyíteni a TRPV1-et (Jung *et al.*, 2004).

Figyelembe véve, hogy a nociceptív primer afferens neuronok sejtteste és perifériás végződése struktúrális és funkcionális szempontból jelentős különbségeket mutat (lásd 2. pont), a fenti nagy számú, sejttesten végzett *in vitro* vizsgálat jelentősége a nocicepció szempontjából

mege erősítésre szorul. Ugyancsak kevés az olyan vizsgálat, amelyben a PKC- és PKA-aktiváció szenzibilizáló hatását ugyanabban a kísérletes modellben hasonlították össze (Hu *et al.*, 2002; Mohapatra és Nau, 2003; Sugiura *et al.*, 2004), lehetővé téve a két enzim funkcionális jelentőségének összevetését. Számos esetben ellentmondó eredmények születtek: pl. az NGF facilitáló hatása PKA-függő volt patkány szenzoros neuronokon, de PKC-függőnek mutatkozott egér hasonló sejtjein (Shu és Mendell, 2001; Bonnington és McNaughton, 2003). Relatív kevés információ áll rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a TRPV1 nem-stimulált, bazális érzékenysége beállításában mi a kétféle protein-kináz enzim egymáshoz viszonyított szerepe: a PKC gátlása egyes vizsgálatokban csökkentette a kapszaicin hatását TRPV1-gyel transzfektált nem-neuronális sejtekben és primer afferens neuronokban *in vitro*, viszont a PKA gátlása nem befolyásolta azt (German *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Amadesi *et al.*, 2004; Shu és Mendell, 2001; Hu *et al.*, 2002; Bonnington és McNaughton, 2003).

1.4.1.3. TRPV1-antagonisták, mint potenciális, perifériás támadáspontú analgetikumok

A ruténiumvörös és a capsazepin voltak az elsőként kifejlesztett kapszaicin- (mai ismereteink szerint TRPV1-) antagonisták, amelyeket korai kísérletekben munkacsoportunk is vizsgált (Pethő és Szolcsányi, 1990; Szolcsányi *et al.*, 1991). Előbbi az ionotróp receptor kationcsatorna-részét blokkolja (Amann és Maggi, 1991), míg utóbbi (és a jód-resiniferatoxin, I-RTX) kompetitíve gátolja a kapszaicin kötődését a TRPV1-hez (Urbán és Dray, 1991; Bevan *et al.*, 1992; Wahl *et al.*, 2001; Seabrook *et al.*, 2002; Undem és Kollarik, 2002). Hangsúlyozandó, hogy egyik ágens sem szelektív a TRPV1-re: a ruténiumvörös a TRPV2–4 receptorokat (lásd később) is blokkolja, míg a capsazepin a TRPM8-csatornát (lásd később) és a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákat is gátolja (a referenciákat illetően lásd Trevisani és Gatti, 2013).

Amint arra már korábban (1.4.1.1. pont) utalás történt, a TRPV1-receptort számos olyan endogén mediátor képes aktiválni, amelyek gyulladás, szövetkárosodás, idegsérülés során szintetizálódnak vagy szabadulnak fel. Ez a tény vetette fel először annak lehetőségét, hogy a TRPV1 farmakológiai blokkolása a fenti állapotokban fájdalomcsillapító hatást eredményezhet. 2000-ben hozzáférhetővé váltak TRPV1-génhiányos („Knock-Out”, KO) egerek, amelyek vizsgálata során kiderült, hogy a TRPV1 hiánya gyulladásos modellekben a termális hiperalgéziát szinte teljesen kivédte (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000). Minthogy a termális hiperalgézia döntően perifériás szenzibilizáció eredménye (Treede *et al.*, 1992), valószínűsíthető volt a perifériás nociceptorokban expresszáldó TRPV1 domináns szerepe a hiperalgéziában. Gyulladásos modellekben a TRPV1 fokozott expresszióját sikerült kimutatni. Mindez számos gyógyszergyárnak nagy lendületet adott TRPV1-receptor-antagonisták, mint új

típusú, perifériás támadáspontú analgetikumok fejlesztéséhez. Ennek eredményeképpen több mint 20 vegyület került preklinikai vizsgálatra (Trevisani és Gatti, 2013; Tabrizi *et al.*, 2017). Állatkísérletes vizsgálatokban megerősítették hatékonyságukat nemcsak termális, hanem mechanikai hiperalgésia-modellekben is. Kiderült, az is, hogy a szerek nemcsak gyulladásos, hanem egyes neuropátiás, illetve daganatos fájdalommodellekben is antihiperalgetikus hatásúak.

Az ígéretes preklinikai vizsgálatok után számos TRPV1-antagonista került a klinikai kipróbálás stádiumába: 2013-ban 15 vegyület állt klinikai kipróbálás alatt 1-es vagy 2-es fázisban. A legtöbb szer közös tulajdonsága, hogy egyaránt gátolja a kapszaicin, az alacsony pH és forró ingerek TRPV1-aktiváló hatását (ún. első generációs TRPV1-antagonisták). Ezek a vegyületek klinikai hatékonyságot mutattak fogfájdalomban és osteoarthritishez társuló fájdalomban. Azonban két nem várt mellékhatásukra derült fény. Az egyik a testhőmérséklet megemelkedése (hipertermia, pl. az AMG-517, ABT-102, AZD-1386 esetében), amely esetenként jelentős volt, bár a szer ismételt adása során mérséklődött. A hipertermia pontos mechanizmusa máig nem tisztázott, fontos azonban, hogy léteznek olyan – második generációs – TRPV1-antagonisták (pl. AMG-8562, BCTP), amelyek gátolják a kapszaicin TRPV1-aktiváló hatását, de nem az alacsony pH-ét (ún. modalitásspecifikus antagonizmus), és amelyek nem okoznak hipertermiát. A másik nem várt probléma a termális fájdalomküszöb megemelkedése volt (emellett a küszöbfeletti hőingerek detektálása is károsodást mutatott), ami forrázásos sérülésekhez vezetett pl. zuhanyozás vagy meleg italok fogyasztása kapcsán (SB705498, MK-2295, AZD-1386 esetében). Amint arról a 1.4.1.4. pontban részletesen szó lesz, patkányban és egérben a TRPV1 genetikai hiánya vagy farmakológiai blokkolása nem emelte meg a nociceptív hőküszöböt (bár az intenzív, masszívan küszöbfeletti hőingerek detektálását károsította). A hőküszöbemelő hatás tehát speciesfüggőnek tűnik, és – ellentétben a hipertermiával – nem csökken ismételt adás során. Mára jelentősen lecsökkent az optimizmus annak tekintetében, hogy a TRPV1-antagonistákból lesz-e analgetikum. Mindazonáltal él az a farmakológiai megalapozott remény, hogy olyan modalitásspecifikus antagonisták, amelyek nem gátolják a TRPV1 hővel való aktiválhatóságát, de csökkentik az agonisták izgató hatását, nem fogják károsítani az alaphelyzeti termonocicepciót.

1.4.1.4. A TRPV1 szerepe a forró ingerek detektálásában

Ismert, hogy a TRPV1-csatorna aktivációs küszöbe 43°C (Caterina *et al.*, 1997). Ez az érték hasonló az izolált primer afferens neuronok, a polimodális nociceptorok aktivációs küszöbéhez, valamint az ember bőrén mért termális fájdalomküszöbhez (Nagy és Rang, 1999a; Perl, 1996; Yarnitsky és Ochoa, 1990). Mindezek alapján jogosnak tűnt a feltételezés, hogy a

nociceptív hőküszöböt a TRPV1-csatorna határozza meg. Meglepő módon a TRPV1-génhiányos egereken végzett vizsgálatok ezt nem támasztják alá. A latenciaidő-mérésen alapuló termonociceptív magatartási módszerekkel az alacsonyabb (küszöbközele) ingerintenzitások esetén nem sikerült eltérést kimutatni sem a farkon, sem a talpon; ugyanakkor magasabb ingerlési intenzitások/hőmérsékletek esetén a latenciaidő megnyúlását tapasztalták (**1. táblázat**).

1. táblázat: A TRPV1-receptor szerepe a bazális nociceptív hőküszöb meghatározásában TRPV1-génhiányos egerek latenciaidő-mérésen alapuló termonociceptív viselkedési tesztekben történő vizsgálata alapján.

Vizsgálati módszer	TRPV1-génhiányos egérben mért latenciaidő-változás a vad típushoz képest	Hivatkozás
Farokimmerziós teszt	46 °C, 48 °C: nincs különbség 50 °C, 52 °C: latencia-megnyúlás	Caterina <i>et al.</i> , 2000
	48 °C: nincs különbség 50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C: latencia-megnyúlás	Park <i>et al.</i> , 2011
	46 °C, 48 °C: nincs különbség 50 °C, 52 °C: latencia-megnyúlás	Marics <i>et al.</i> , 2014
Forró lap módszer	50 °C: nincs különbség 52,5 °C, 55 °C, 58 °C: latencia-megnyúlás	Caterina <i>et al.</i> , 2000
	50 °C, 52,5 °C: nincs különbség	Davis <i>et al.</i> , 2000
	52,5 °C, 55 °C, 58 °C: latencia-megnyúlás	Park <i>et al.</i> , 2011
	48 °C, 50 °C: nincs különbség 52 °C, 55 °C: latencia-megnyúlás	Marics <i>et al.</i> , 2014
Hargreaves-féle plantárteszt	6,5, 7,5, 8-as intenzitás: nincs különbség 8,5-ös intenzitás: latencia-megnyúlás	Caterina <i>et al.</i> , 2000
	nem közölt intenzitás: nincs különbség	Davis <i>et al.</i> , 2000
	6,5, 8-as intenzitás: nincs különbség 9-es intenzitás: latencia-megnyúlás	Hoffmann <i>et al.</i> , 2013
	nem közölt intenzitás: nincs különbség	Pogatzki-Zahn <i>et al.</i> , 2005
	nem közölt intenzitás: nincs különbség	Banik és Brennan, 2009
	nem közölt intenzitás: latencia-megnyúlás	Wang <i>et al.</i> , 2008

Hasonló adatokat nyertek TRPV1-antagonisták alkalmazásával egérben és patkányban (2. táblázat).

2. táblázat: A TRPV1-receptor-antagonisták hatása a latenciaidő-mérésen alapuló termonociceptív viselkedési tesztekben egerekben és patkányokban.

Antagonista	Paradigma	Referencia	TRPV1 szerepe
DD161515 DD191515	forró lap (52 °C), egér farokimmerzió (52 °C), egér	García-Martinez <i>et al.</i> , 2002	+
IBTU	tail-flick (52 °C) egér,	Tang <i>et al.</i> , 2007	+
A-425619	forró lap (55 °C) egér plantárteszt, patkány	Honore <i>et al.</i> , 2005	–
AMG0347	plantárteszt, patkány	Wu <i>et al.</i> , 2008	–
BCTC	plantárteszt, patkány	Pomonis <i>et al.</i> , 2003	–
ABT-102	plantárteszt, patkány	Honore <i>et al.</i> , 2009	–
JNJ-17203212	farokimmerzió (50 °C), egér	Huang <i>et al.</i> , 2011	+
SB366791	plantárteszt, egér	Chen <i>et al.</i> , 2011	–

Ezzel szemben a TRPV1-antagonisták emberben történő tesztelése során a termális fájdalomküszöb megemelkedését tapasztalták a küszöbfeletti hőingerek detektálásának károsodásával együtt (3. táblázat).

3. táblázat: TRPV1-receptor-antagonisták hatása az emberi bőrön mért termális fájdalomküszöbre.

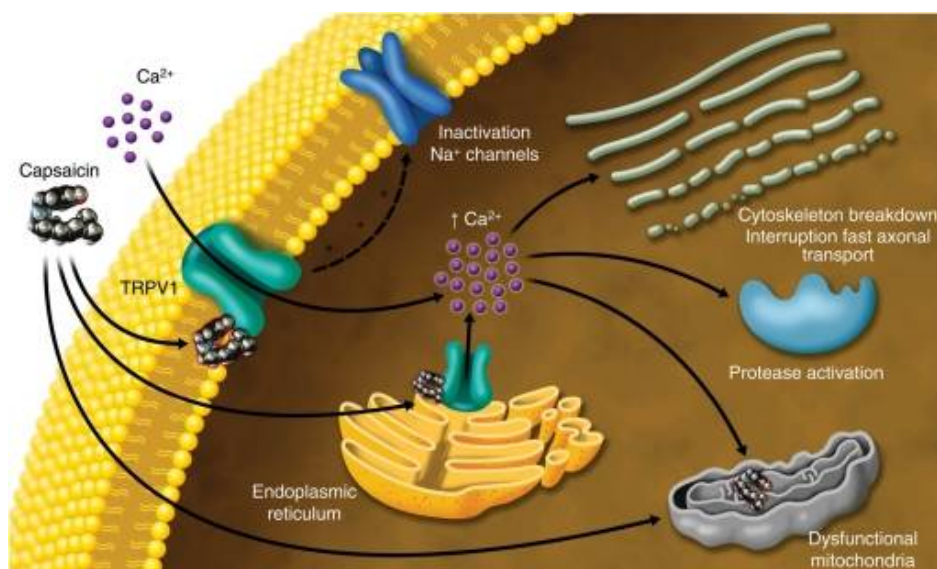
Antagonista	Paradigma	Referencia	TRPV1 szerepe
SB-705498	hőküszöbmérés a bőrön komputer-vezérelt Peltier- elemmel	Chizh <i>et al.</i> , 2007	+
ABT-102	hőválasz mérése a bőrön küszöbfeletti hőingert adó széndioxid-lézer és vizuális analóg skála alkalmazásával	Schaffler <i>et al.</i> , 2013	+
ABT-102	hőküszöb és hőválasz mérése bőrön és szájnyálkahártyán	Rowbotham <i>et al.</i> , 2011	+
MK-2295	hőküszöbmérés a bőrön	Eid, 2009	+
AZD-1386	hőküszöbmérés a bőrön	Chizh <i>et al.</i> , 2009	+

Említésre méltó, hogy a génhiányos egerek perifériás idegeiben (n. saphenus, n. tibialis) futó C polimodális nociceptorok aktivációs hőküszöbe nem különbözik a vad típusúakétól (Caterina *et al.*, 2000; Woodbury *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2005; Banik és Brennan, 2009; Hoffmann *et al.*, 2013). A TRPV1–4-receptorok ioncsatorna részét blokkoló ruténiumvörös nem befolyásolta az izolált patkánybőr C polimodális nociceptoraiban sem a hőküszöböt, sem a hőválasz nagyságát (St. Pierre *et al.*, 2009).

1.4.1.5. A TRPV1-receptor által közvetített szenzoros deszenzibilizáció

Kapszaicin vagy más TRPV1-receptor-agonista, mint pl. RTX magasabb koncentrációban és/vagy hosszabb ideig és/vagy ismételten történő alkalmazása esetén a kezdeti izgató, fájdalomkeltő hatás lecsengése után egy másodlagos effektus, a csökkent válaszkészség formájában manifesztálódó ún. deszenzibilizáció alakul ki (Szolcsányi, 1987a; 1987b; Szolcsányi, 1993). Ennek a deszenzibilizációnak két formája, illetve stádiuma különböztethető meg. Alacsonyabb agonistakoncentrációk és rövidebb expozíciós idők mellett csak maga a **TRPV1-receptor deszenzibilizálódik**, vagyis a TRPV1-et expresszáló nociceptív idegvégződés csak azon ingerekkel szemben mutat csökkent válaszkészséget, amelyek a TRPV1-en hatnak (pl. kapszaicin, RTX). Ennek a – homológ deszenzibilizációként – értelmezhető jelenségnek a hátterében a TRPV1 defoszforilációja áll: a TRPV1-en keresztül beáramló nagyobb mennyiségű Ca^{2+} a kalmodulinnal komplexet képezve aktiválja a kalcineurint (= protein-foszfataz-2B), amely defoszforilálja a TRPV1-et, csökkentve annak válaszkészségét (Cholewinski *et al.*, 1993; Docherty *et al.*, 1996; Koplas *et al.*, 1997; Mohapatra és Nau, 2005). E mechanizmusnak megfelelően fehérjefoszforiláló enzimek, pl. a PKA aktiválása képes csökkenteni a TRPV1 deszenzibilizációját (Mohapatra és Nau, 2003).

Magasabb agonistakoncentrációknál és hosszabb expozíciós időknél **idegvégződés-szintű deszenzibilizáció** jön létre: hő, mechanikai és kémiai ingerekkel szemben egyaránt csökken a polimodális nociceptorok reaktivitása (heterológ deszenzibilizáció). Szolcsányi önkísérletben igazolta, hogy a nyelv 1%-os kapszaicinoldatba történő bemártása kivédte a kapszaicin, a mustárolaj és a zingeron fájdalomkeltő hatását, de nem befolyásolta a taktilis és hideg ingerek hatását, valamint az ízérzést (Szolcsányi, 1977). Emberi alkar bőrén a „blister base” előkezelése 1%-os kapszaicinoldattal gátolta a kapszaicin, bradikinin, acetilkolin fájdalomkeltő hatását, de nem a kálium-kloridét (Szolcsányi, 1977). Elektrofiziológiai kísérletekben a C polimodális nociceptorok receptív területének deszenzibilizációja csökkentette a végződés válaszát forró és mechanikai ingerre, valamint kapszaicinre, bradikininre és xilolra (Szolcsányi, 1987a). Az idegvégződés-szintű deszenzibilizáció részeként gátlódik a peptiderg



4. ábra (Anand és Bley, 2011). A kapszaicinnel kiváltott idegvégződés-szintű deszenzibilizáció feltételezett mechanizmusai. A részleteket lásd a szövegben. A nociceptív idegvégződésben az endoplazmás retikulum szerepe kizárható, de analóg funkciójú, kevésbé organizált intracelluláris Ca raktáré feltételezhető.

neuronok lokális efferens funkciója (pl. a neurogén gyulladás, lásd 1.5. pont) is, jelezve, hogy masszívabb károsodás a neuropeptidek deplécióját okozza a terminálisban. A deszenzibilizáció hátterében a nociceptív idegvégződés funkcionális/morfológiai károsodása áll. Ezt a TRPV1-en keresztül beáramló nagy mennyiségű Ca^{2+} és Na^+ indítja el, és mértéke az percek–órákon belül kialakuló és rövid ideig tartó, reverzibilis funkciócsökkenéstől (pl. a feszültségfüggő Na^+ - és Ca^{2+} -csatornák gátlása) az idegvégződés több nap alatt kialakuló, és annak tartós károsodását okozó degenerációjáig terjedhet (Szolcsányi *et al.*, 1975; Simone *et al.*, 1998; Dux *et al.*, 1999; Nolano *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005). Ebben szerepet játszhat proteázok aktiválódása, ozmotikus duzzadás, a mikrotubulusok depolimerizációja miatt az axonális transzport gátlása, a mitokondriumok funkciójának károsodása (**4. ábra**). Szisztémásan adott kapszaicinnel kiváltott deszenzibilizáció esetén karakterisztikus változás a DRG és trigeminális neuronok sejttestében kimutatható mitokondriális duzzadás, amely a cornealis idegvégződésekben is létrejön lokális kapszaicinkezelés után (Joó *et al.*, 1969; Szolcsányi *et al.*, 1975). A következményes energiatermelési zavar magyarázhatja a degeneráció hiányában kialakuló funkcionális károsodást.

1.4.2. TRPV2

A ma TRPV2-nek nevezett ioncsatornát vanilloid-receptor-like protein 1 (VRL-1) néven írták le 1999-ben, mint a TRPV1 (akkori nevén VR1) szerkezeti analógját (Caterina *et al.*, 1999). A TRPV2 is hat transzmembrán doménből épül fel, és homo- vagy TRPV1-gyel képzett

heterotetramerként funkcionál mint nem-szelektív kationcsatorna. Transzfektált sejtekben 53 °C feletti hőingerral, illetve 2-amino-etoxidifenilboráttal aktiválható, de kapszaicinnel, RTX-szel, alacsony pH-val nem. A ruténiumvörös blokkolja, de a capsazepin nem. Expresszióját a közepes és nagy méretű DRG neuronok egy alcsoportjában mutatták ki, a TRPV1-gyel, SP-vel és IB₄-gyel nem mutatott kolokalizációt. A gerincvelő hátsó szarvában, valamint nem neuronális sejtekben, pl. immunsejtekben is igazolták jelenlétét. Aktivációs küszöbe és DRG-beli celluláris lokalizációja alapján valószínűsíthető, hogy a TRPV2 felelős a tenyésztett primer afferens neuronokban forró ingerrel kiváltott ionáram magas küszöbű formájáért (Caterina *et al.*, 1999; Ahluwalia *et al.*, 2002). Szintén feltételezik, hogy ezeknek a TRPV2-t expresszáló neuronoknak a perifériás végződése a hővel és mechanikai ingerrel aktiválható A δ nociceptorok magas hőküszöbű csoportjának (I-es típusú AMH) felelnek meg (Ahluwalia *et al.*, 2002). A szakirodalom egyetért abban, hogy a TRPV2 nem játszik szerepet a nociceptív hőküszöb beállításában, nemcsak magas aktivációs küszöbe, hanem a TRPV2-génhiányos egerekben tapasztalt fenotípus miatt sem: sem a farokimmerziós, sem a forró lap, sem a Hargreaves-féle plantártesztben nem volt különbség a génhiányos és a vad típusú állatok latenciaideje között, még 54–58 °C-on végzett stimuláció esetén sem (Park *et al.*, 2011). Ez utóbbi adat arra utal, hogy az I-es típusú AMH nociceptorok magas hőküszöbének beállításában sem játszik szerepet a TRPV2. A TRPV1/TRPV2 kettős KO egerek reakciója a fenti tesztekben azonos volt a TRPV1-génhiányos állatokéval, ami kizárja azt a lehetőséget, hogy a TRPV1 jelenléte maszkírozta volna a TRPV2 hiányának a következményét. A TRPV2 hiánya nem befolyásolta a komplett Freund-adjuvánssal kiváltott gyulladásos, illetve a spinálisideg-lekötéssel keltett neuropátiás termális hiperalgéziát sem. Egy másik vizsgálatban azt találták, hogy a TRPV1-génhiányos egerekben a forró ingerrel aktiválható neuronok 82%-a nem expresszálta a TRPV2-t, ami szintén a csatorna szerepének hiányára utal (Woodbury *et al.*, 2004). Összefoglalóan elmondható, hogy nagy valószínűséggel a TRPV2 nem játszik szerepet a forró ingerrel kiváltott magatartási reakciókban sem fizioológias, sem hiperalgéziás állapotban.

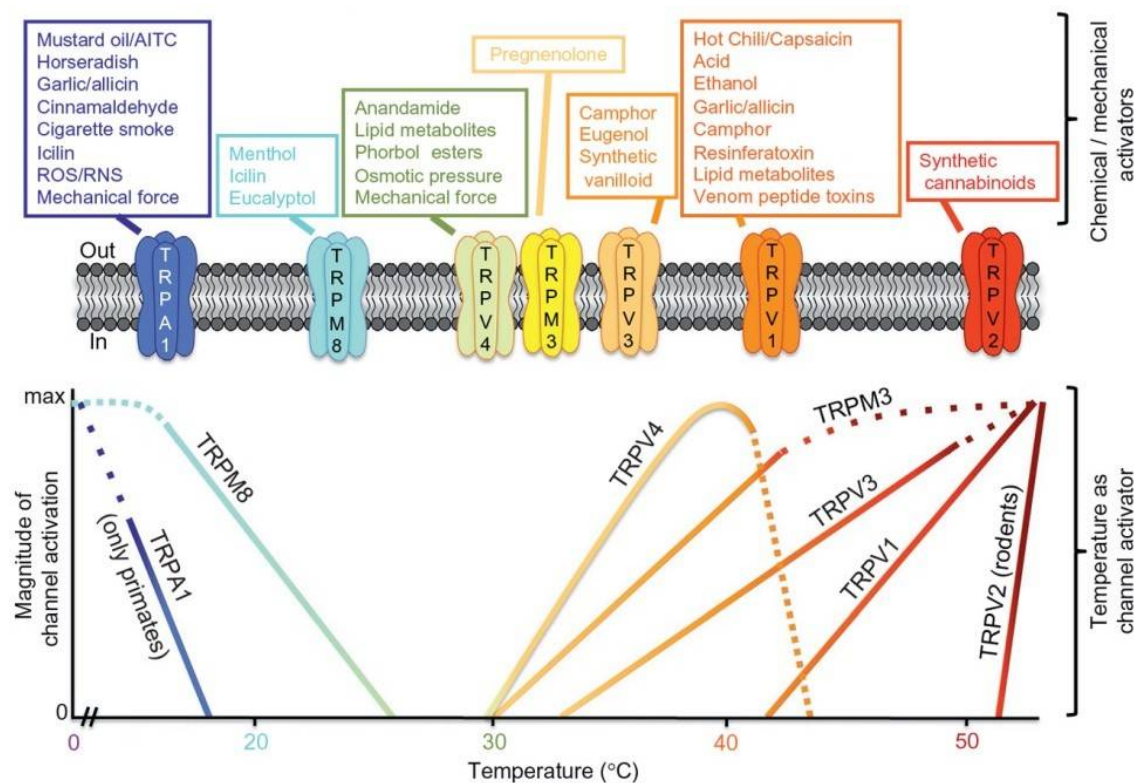
1.4.3. TRPV3

A TRPV3-csatornát – a korábban ismert TRPV-csatornák szekvenciáinak analízise alapján – humán szenzoros neuronokból és rágszálók keratinocytaiból klónozták (Peier *et al.*, 2002a; 2002b; Xu *et al.*, 2002). A szintén tetramer formációban, nem-szelektív kationcsatornaként működő struktúra termális aktivációs küszöbe 33 °C körül van, tehát már a nem fájdalmas meleg is aktiválja. A hőmérséklet fájdalmas tartományba való emelésével a csatorna által közvetített áram intenzitása nő. Más aktiváló stimulusai közül a kámfor, az eugenol

és a 2-amino-etoxidifenilborát emelendő ki. Expressziós mintázata speciesfüggő: egerben keratinocytákban expresszálódik, de a primer szenzoros neuronokban nem (Peier *et al.*, 2002b); ellenben emberben szenzoros neuronokban koexpresszálódik a TRPV1-gyel, és megtalálható a keratinocytákban is (Xu *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Gopinath *et al.*, 2005). Összhangban a csatorna 33 °C körüli aktivációs küszöbével TRPV3-génhiányos egerekben a pozitív termotaxis (35 °C irányába) részleges csökkenését figyelték meg (Moqrich *et al.*, 2005). A termonocicepció vizsgálata során a TRPV3-génhiányos egerekben latenciamegnyúlást tapasztaltak a farokimmerziós teszt és a forró lap esetében is, de csak a masszívan küszöbfeletti stimulációs hőmérsékleteknél (50, illetve 55 °C), a 45–48 °C-os tartományban nem. Komplettn Freund-adjuvánssal vagy bradikininnel kiváltott termális hiperalgéziában (plantárteszttel vizsgálva) nem találtak fenotípus-változást a TRPV3-génhiányos egerekben.

1.4.4. TRPV4

A TRPV4-ioncsatornát először mint hipoozmotikus közeggel aktiválható, azaz mechanoszenzitív nem-szelektív kationcsatornát azonosították. Később derült ki, hogy a korábbi adatokkal ellentétében transzfektált sejtekben, illetve eger keratinocytákban hőingerekkel is aktiválható, küszöbe az expressziós rendszertől függően 25–34 °C (Güler *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2003). Ellentétben a TRPV3-mal, magasabb hőmérséklet (forró inger) hatására a csatorna működése gátlódik. Kémiai aktivátoraihoz tartozik az anandamid és a forbolésztetek. A TRPV4 expresszióját leírták a vese disztális tubulusaiban, a hypothalamusban, bőr keratinocytáiban, ugyanakkor a primer afferens neuronokban való előfordulását illetően ellentmondásosak az adatok (lásd Dhaka *et al.*, 2006). A TRPV4-génhiányos egerekben mind a hipo-, mind a hiperozmotikus ingerre adott válasz károsodik, hasonlóan a fájdalmas mechanikai ingerek detektálásához, de ezen állatok a forró lapon (45–50 °C), vagy a plantártesztben vizsgálva nem mutattak fenotípusos eltérést a termonocicepciót illetően (Liedtke és Friedman, 2003; Suzuki *et al.*, 2003; Todaka *et al.*, 2004). Ezzel ellentétben a farokimmerziós tesztben – noha a 47–50 °C-os tartományban nem volt különbség a TRPV4-KO állatokban – 45 és 46 °C-on vizsgálva a génhiányos állatokban hosszabb latenciaidőt mértek, mint a vad típusúakban (Lee *et al.*, 2005). Szintén ellentmondásosak az adatok a TRPV4 termális hiperalgéziában játszott szerepét illetően: egy vizsgálatban a carrageninnel, illetve kapszaicinnel kiváltott hiperalgézia jelentős gátlását tapasztalták TRPV4-génhiányos állatokban a vad típusúhoz képest, míg egy másik esetben a komplett Freund-adjuvánssal keltett gyulladás nem eredményezett eltérést a két genotípus között a termális grádiens tesztben (Todaka *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).



5. ábra. A hőérzékeny TRP-csatornák aktivátorai és termális ingerre adott válaszáinak jellege (Mickle *et al.*, 2015).

Egy ismételt, alapos analízisben (Huang *et al.*, 2011) kétfajta genetikai alapon (C57BL6 és 129S6) konstruált törzseket felhasználva vizsgálták TRPV3-génhiányos, valamint kettős (TRPV3 és TRPV4) KO egerek nociceptív magatartási válaszkészségét a farokimmerziós tesztben (48–52 °C), a forró lapon (52,5 és 55 °C) és a plantártesztben. Nem találtak szignifikáns különbséget a vad típushoz képest egyik esetben sem (kivéve a kettős KO-t a plantárteszt esetében, amelynél enyhe latenciamegnyúlás volt mérhető), még TRPV1-antagonistával végzett előkezelés és/vagy komplett Freund-adjuvánssal kiváltott és plantárteszttel mért termális hiperalgéria esetében sem. Az összes rendelkezésre álló adat fényében valószínűsíthető, hogy bár a TRPV3 és/vagy a TRPV4 marginális szerepe egérben a magatartási tesztekkel vizsgált termonocicepcióban nem zárható ki, de ezen ioncsatornák nagy valószínűséggel nem vesznek részt a nociceptív hőküszöb beállításában.

1.4.5. TRPM3

A TRP melastatin-3 (TRPM3) csatornát kezdetben elsősorban az emberi vesében, kisebb mértékben az agyban, herében és gerincvelőben expresszálódó, hipoozmotikus környezettel aktiválható nem-szelektív, de dominánsan Ca^{2+} -permeábilis kationcsatornaként azonosították. Kimutatták azt is, hogy a TRPM3 mRNS-e megtalálható a primer afferens neuronokban, és a csatorna kémiai aktivátora, a pregnenolon-szulfát egérben fájdalomkeltő (Nealen *et al.*, 2003;

Lechner *et al.*, 2009; Staaf *et al.*, 2010; Ueda *et al.*, 2001). A csatorna termonocicepcióban játszott szerepével kapcsolatban Vriens és munkatársai (2011) végeztek úttörő munkát. Funkcionális TRPM3-csatornák expresszióját igazolták egér szenzoros (DRG és trigeminális) neuronjaiban a TRPV1-gyel és TRPA1-gyel (lásd 1.4.8. pont) kolokalizációban, valamint TRPM3-génhiányos állatok segítségével megerősítették a pregnenolon-szulfát TRPM3-aktiváló hatását mind *in vitro*, mind *in vivo*. Azt is kimutatták, hogy a csatorna hővel ($> 30\text{ }^{\circ}\text{C}$) is aktiválható. TRPM3-génhiányos egerekben a farokimmerziós tesztben a $45\text{--}57\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os tartományban a latenciaidő megnyúlt, míg a forró lapon $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on nem, de az $52\text{--}58\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on volt latenciaidő-megnyúlás a vad típushoz képest. Végül, de nem utolsósorban a komplett Freund-adjuvánssal kiváltott és forró lappal mért termális hiperalgémia teljes mértékben hiányzott a TRPM3-génhiányos egerekben. Mindezek alapján elmondható, hogy a TRPM3 szerepet játszik a termonocicepcióban, mind alapállapotban, mind a hiperalgémiaiban; ez utóbbi szerepének mértéke a TRPV1-ével összemérhető (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000). Említésre méltó, hogy TRPM3-génhiányos állatok szenzoros neuronjainak egy része TRPV1-antagonista jelenlétében is reagált forró ingerekre. A TRPM3 növényi eredetű potens és szelektív gátlói is ismertté váltak, amelyek a forró lapon $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on megnyújtották a nocifenzív reakció latenciaidejét i.p. előkezelést követően, igazolva a csatorna szerepét a forró ingerek detektálásában (Straub *et al.*, 2013a, 2013b).

1.4.6. Anoktamin 1

Ezt az ioncsatornát három munkacsoport azonosította egymástól függetlenül Ca^{2+} -aktiválta Cl^{-} -csatornaként (Caputo *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növelésével kiváltott, befelé irányuló Cl^{-} -áram már korábban is ismert volt, de a közvetítő ioncsatorná(k) egyértelmű molekuláris azonosítása még nem történt meg. Az anoktamin 1 (ANO1) 2008 előtt TMEM16-ként volt ismert, mint azonosítatlan funkcióval rendelkező transzmembrán fehérje. Az anoktamin 1 név arra utal, hogy 8 transzmembrán doménnel rendelkezik, és ezen szokatlan struktúra révén az ioncsatornák egy teljesen új családjának első ismert tagja (Yang *et al.*, 2008). Expresszióját mirigyek szekréciós epithelsejteiben, a retinában és szenzoros neuronokban mutatták ki. Utóbbiakat illetően azt találták, hogy 78%-ban kolokalizálódik a TRPV1-gyel, mutatva, hogy az ANO1 dominánsan a nociceptív DRG neuronokban expresszálódik, azon belül pedig nagyjából a nem peptiderg, kisebb részben a peptiderg alpopulációban (Cho *et al.*, 2012).

Ezt követően kiderült, hogy az ANO1 transzfektált sejtekben hővel is aktiválható, $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os küszöbhőmérséklettel befelé irányuló Cl^{-} -áramot közvetít (Cho *et al.*, 2012). TRPV1

génhiányos (TRPV1^{-/-}) egerekből származó tenyésztett DRG neuronokban a hőingerlés depolarizációt és Cl⁻-áramot váltott ki 44 °C-os aktivációs küszöbvel, akkor is, ha a Ca²⁺-t intracelluláris kelát formájában megkötötték, mutatva, hogy a Cl⁻-áramot nem az intracelluláris Ca²⁺ emelkedése váltotta ki. Ugyanakkor a hőingerlés és az intracelluláris Ca²⁺-szint közötti facilitáló interakciót is sikerült kimutatni. Ennek részeként az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció emelésekor az ANO1 termális aktivációs küszöbe lecsökkent, akár a normál szöveti hőmérsékletig. Ellenben az intracelluláris Cl⁻-koncentráció csökkentése csaknem teljesen legátolta a hővel kiváltott Cl⁻-áramot. Mindez csak úgy értelmezhető, hogy a DRG neuronokban expresszálandó ANO1 aktivációjakor a Cl⁻-ionok *kifelé* áramlanak, ezáltal okozva depolarizációt. Ezt az teszi lehetővé, hogy e neuronokban magas intracelluláris Cl⁻-koncentráció jön létre a Na⁺–K⁺–Cl⁻-kotranszporter fokozott expressziója és működése révén (Price *et al.*, 2009). Gyulladásos mediátorok, mint pl. hisztamin, szintén képesek kiváltani depolarizáló hatású Cl⁻-áramot a DRG neuronokban, felvetve annak lehetőségét, hogy a jelátviteli folyamataik során fellépő intracelluláris Ca²⁺-szignál aktiválja az ANO1-et. A Ca²⁺-aktiválta Cl⁻-csatornák szerepe a bradikinin hatásaiban mint jelátviteli mechanizmus jól dokumentált, beleértve a bradikinin fájdalomkeltő hatását is (a részleteket lásd Pethő és Reeh, 2012). Nemrég kimutatták, hogy a koexpresszálandó TRPV1 és ANO1 között egy közvetlen fizikai kapcsolat révén megvalósuló interakció van: a TRPV1-en keresztül beáramló Ca²⁺ aktiválja az ANO1-et (Takayama *et al.*, 2015). Ezzel magyarázható, hogy a kapszaicinnal DRG neuronokban kiváltott membrádepolarizáció, illetve akciós potenciál két komponenssel bír: TRPV1-mediálta kation-beáramlás és ANO1-közvetítette Cl⁻-efflux. Mivel az egér talpába adott kapszaicin algogén hatását lehetett gátolni ANO1-antagonistával, ez az interakció *in vivo* is relevánsnak tűnik.

A DRG neuronokban a forró ingerrel kiváltott depolarizáló ionáramot a TRPV1-et blokkoló capsazepin önmagában csökkentette, a Ca²⁺-aktiválta Cl⁻-áramot gátló mefloquinnal kombinálva közel teljesen kivédte, jelezve, hogy a termonociceptorok sejttestén a TRPV1 mellett az ANO1 is részt vesz a forró ingerek detektálásában (Cho *et al.*, 2012). Az ANO1 szelektív genetikai ablációja egér DRG neuronokban („conditional” KO) a forró ingerek érzékelésének zavarát okozta: a farokimmerziós tesztben az 50–54 °C-os tartományban, illetve a Hargreaves féle plantártesztben alkalmazott magasabb ingerintenzitás esetében latenciaidő-megnyúlást tapasztaltak (Cho *et al.*, 2012). Mindez azt mutatja, hogy az ANO1 részt vesz a forró ingerek detektálásában mind az egér farkán, mind a talpán, de igazoltan csak a küszöbfeletti hőingerek esetében (küszöbkezeli ingerekre vonatkozó adat hiányában a nociceptív küszöbre vonatkozóan nincs megbízható információ).

Vad típusú egérben az ANO1-et blokkoló mefloquin szisztémás adása megnyújtotta a „tail-flick” tesztben mért latenciaidőt, és teljesen kivédte a talpba adott carrageninnel kiváltott és a plantárteszttel vizsgált termális hiperalgéziát (Cho *et al.*, 2012). Az ANO1 szelektív funkcionális ablációja egér DRG neuronjaiban a carrageninnel kiváltott, illetve neuropátiás modellben létrehozott termális hiperalgéziát és mechanikai allodyniát egyaránt gátolta (Lee *et al.*, 2014). Ezenkívül a talpba adott bradikinin és formalin nocifenzív reakciót keltő hatását is csökkentette. Mindezek jelzik, hogy – a TRPV1-hez és TRPM3-hoz hasonlóan – az ANO1 is jelentős szerepet játszik a gyulladásos és neuropátiás termális hiperalgézia, illetve mechanikai allodynia kialakulásában.

1.4.7. TRPM8

A TRPM8 volt az elsőként azonosított hideggel aktiválható TRP-csatorna (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002a). Aktivációs küszöbe 26 °C körül van, a kiváltott ionáram mind a nem fájdalmas (15 °C-ig), mind a fájdalmas hidegtartományban (15–8 °C) növekszik. A hűsítő kémiai ágensek (mentol, eukaliptol, icilin) hatásos (ámde nem szelektív) aktivátorai a TRPM8-nak, hatásukra a csatorna aktivációs küszöbe emelkedik. A TRPM8 szintén nem-szelektív kationcsatornát foglal magába, és homotetramer formában működik. Olyan primer afferens neuronokban expresszálódik, amelyek A δ és C rostokkal rendelkeznek. Bár a korábbi vizsgálatokban a TRPM8 nem mutatott kolokalizációt a TRPV1-gyel, IB₄-gyel vagy SP-vel, újabban a fentiekkel való koexpressziót támogató adatok láttak napvilágot (Takashima *et al.*, 2007). Azt is kimutatták, hogy a mentolérzékeny DRG neuronok – amelyek egyben hűtéssel is aktiválhatók – közel fele kapszaicinnel is aktiválható (Xing *et al.*, 2006). A TRPM8-at expresszáló DRG neuronok tehát két alcsoportra oszthatók: a mentol- és kapszaicinérzékeny (azaz TRPM8-at és TRPV1-et egyaránt kifejező) neuronok nociceptívek, a csak mentollal aktiválhatók (csak a TRPM8-at kifejező) nem-nociceptív természetűek.

A TRPM8-génhiányos egerekben súlyosan károsodik a nem fájdalmas hidegingerek detektálása, és elmarad a hűtéssel kiváltott antinociceptív hatás; a fájdalmas hidegingerekkel szembeni válaszkészség is csökken (bár egy vizsgálat ezt nem erősítette meg), de nem szűnik meg teljesen, jelezve a TRPM8 nem kizárólagos szerepét a fájdalmas hidegingerek felfogásában (Bautista *et al.*, 2007; Colburn *et al.*, 2007; Dhaka *et al.*, 2007; Gentry *et al.*, 2010; Knowlton *et al.*, 2013; Pogorzala *et al.*, 2013). A komplett Freund-adjuvánssal keltett gyulladásos és az ideglegkötéssel kiváltott neuropátiás hidegallodynia is lecsökken a TRPM8 hiányában (Knowlton *et al.*, 2010). Ugyanakkor – az elvárásnak megfelelően – a forró ingerek detektálásában nem

találtak eltérést a TRPM8-génhiányos egerekben sem a forró lapon (48–52 °C), sem a plantárisztestben (Colburn *et al.*, 2007; Knowlton *et al.*, 2013).

1.4.8. TRPA1

A TRPA alcsalád jellemzője és a névadó betű eredete a nagyszámú „ankyrin repeat domain”. A TRPA1-et először humán fibroblastokból klónozták, majd később egér DRG neuronjaiból (Story *et al.*, 2003). A csatorna aktivációs küszöbe 17 °C, amely már közel van a fájdalmas hideg tartományához (< 15 °C) (Story *et al.*, 2003; Bandell *et al.*, 2004). A TRPA1 jelenlétét a TRPV1-et expresszáló DRG neuronok egy 30%-os alpopulációjában mutatták ki. A TRPA1-et kifejező neuronok döntő többsége TRPV1-et és CGRP-t is expresszál, de TRPM8-cal nem mutat koexpressziót (lásd még Pogorzala *et al.*, 2013). A TRPA1-et trigeminális és vagális szenzoros neuronokban, valamint a primer afferens neuronok centrális végződésén (a gerincvelő hátsó szarvában) is kimutatták. Ezen túlmenően megtalálható a belső fülben, az endothelben, a pancreasban is. A TRPA1 funkcionális jellemzője a viszonylag nagy Ca^{2+} -konduktivitás. Számos aktiváló ingerét azonosították (a referenciákat illetően lásd Nilius és Szállási, 2014; Mickle *et al.*, 2015): izotiocianátok (a mustár, torma csípős anyagai), allicin (fokhagymában), akrolein (kipufogógáz irritáns anyaga), formaldehid, reaktív oxigéntermékek (pl. H_2O_2), nitrogén-monoxid, hidrogén-szulfid, szén-dioxid, propofol, isofluran, desfluran, lidokain (magas koncentrációban), morfin, egyes alkoholok, a delta⁹-tetrahidrokannabinol és más fitokannabinoidok.

Bár a TRPA1-et mint fájdalmas hideggel aktiválható ioncsatornát írták le (Story *et al.*, 2003; Bandell *et al.*, 2004; Sawada *et al.*, 2007), későbbi vizsgálatokban nem sikerült hideg ingerrel aktiválni a heterológ expressziójú TRPA1-et (Jordt *et al.*, 2004; Nagata *et al.*, 2005). A hidegérzékelésben betöltött szerepére vonatkozóan is ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre. Ezt jól illusztrálják a TRPA1-génhiányos egereken végzett vizsgálatok: öt munkacsoport nem talált eltérést a hideg ingerekkel kiváltott magatartási reakciókban, illetve egyrost-aktivitásban a vad típushoz képest (20 – -10 °C-os, illetve 5 °C-os fémlapon, valamint a 32–2 °C tartományban) (Bautista *et al.*, 2006; del Camino *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012, Knowlton *et al.*, 2010; Kwan *et al.*, 2009), másik három viszont igen (0, illetve 10 °C-os fémlapon) (Kwan *et al.*, 2006; Karashima *et al.*, 2009; Gentry *et al.*, 2010). Ezzel ellentétben a vagális szenzoros neuronokban sikerült igazolni a TRPA1 – nem kizárólagos – szerepét a fájdalmas intenzitású hidegingerek detektálásában mind patkányban, mind egérben (Fajardo *et al.*, 2008). Mindez mutatja, hogy a hidegingerek transzdukciója eltérő a szomatikus és a vizszerális szenzoros neuronokban. Említésre méltó, hogy 5 °C-os hidegstimulációval

aktiválható DRG neuronok 34%-a reagált mentolra, 18%-a mustárolajra; így feltételezhető, hogy a neuronok közel felében a TRPM8-on és TRPA1-en kívüli más ioncsatorna felelős a fájdalmas hideg detektálásáért (Munns *et al.*, 2007).

Bár újabb adatok szerint a TRPA1 nem-fájdalmas meleg ingerekkel is aktiválható a 22–40 °C-os tartományban (Moparthy *et al.*, 2016), a forró ingerek detektálásában nem találtak eltérést a TRPA1-génhiányos egerekben a vad típushoz képest sem a Hargreaves-féle plantártesztben, sem a forró (50–55 °C) lapon (Bautista *et al.*, 2006; Kwan *et al.*, 2006). Szelektív TRPA1-antagonista nem befolyásolta a patkányban forró lappal (52 °C), egérben plantárteszttel vizsgált alaphelyzeti termonocicepciót (Petrus *et al.*, 2007; Eid *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011). Egy újabb tanulmány azonban meglepő adatokat szolgáltatott: a TRPA1-génhiányos egerekben a n. saphenusról történt egyrost-elvezetési kísérletekben a C polimodális nociceptorok csökkent hőválaszát detektálták a rostok aktivációs küszöbének megemelkedésével, illetve magas ingerlési intenzitás esetén a Hargreaves-teszttel mért latenciaidő is megnyúlt (Hoffmann *et al.*, 2013). Felvetődött a TRPA1 szerepe a mechanikai ingerek transzdukciójában is, bár az adatok ellentmondásosak (Kwan *et al.*, 2006; 2009; Kerstein *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2013). A TRPA1 szerepét különféle hiperalgémia-folyamatokban is igazolták génhiányos egerek, „knock-down” patkányok, illetve szelektív antagonistákkal. Így pl. aktivációja hozzájárul a komplett Freund-adjuvánssal, oxaliplatinnal, paclitaxellel, sebészi bemetszéssel, L5-ös spinális ideg lekötésével kiváltott hideg-hiperalgémiahoz (Obata *et al.*, 2005; Katsura *et al.*, 2006; Petrus *et al.*, 2007; del Camino *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Urata *et al.*, 2015), illetve a komplett Freund-adjuvánssal, L5-ös spinális ideg lekötésével, paclitaxellel, carrageninnel, sebészi incízióval keltett mechanikai hiperalgémiahoz (Petrus *et al.*, 2007; Eid *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2012; Lennertz *et al.*, 2012; Bonet *et al.*, 2013; Urata *et al.*, 2015). Meglepő módon a TRPA1 szerepét néhány olyan modellben is sikerült igazolni, amelyekben forró ingerrel szembeni hiperalgémia, illetve szenzibilizáció alakult ki bradikinin, paclitaxel, sebészi incízió hatására (Bautista *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011; Urata *et al.*, 2015). Mindezen adatok alapján felmerült a TRPA1 blokkolása mint új gyógyszerfejlesztési irány perifériás hatásmódú analgetikumként.

1.4.9. TRPC5

A TRPC5 (C mint „canonical”) csatorna enyhe hűtés hatására aktiválódik a 37–25 °C tartományban (Zimmermann *et al.*, 2011). Egérben a DRG neuronok kb. egyharmadában expresszálódik, mentol nem aktiválja. Hiányában (KO egérben) sem a nem-fájdalmas, sem a fájdalmas hideg ingerek detektálása nem károsodik.

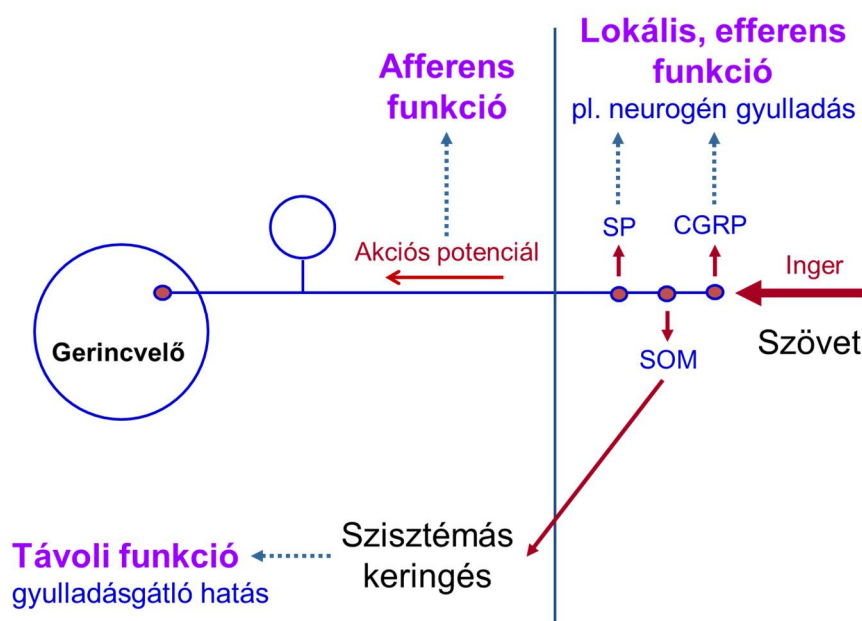
1.5. A peptiderg polimodális nociceptorok hármas funkciója

A különböző neuropeptideket expresszáló polimodális nociceptorok perifériás végződesei – a nem-peptiderg primer szenzoros neuronok terminálisaihoz hasonlóan – rendelkeznek **afferens funkcióval**: adekvát inger hatására membránjukban lokális depolarizáció (receptorpotenciál) alakul ki, amely, ha eléri a feszültségfüggő Na^+ -csatornák aktivációs küszöbét, tovaterjedő akciós potenciálokat vált ki. Az inger intenzitására vonatkozó információ frekvenciakód formájában továbbítódik a központi idegrendszerbe.

A járulékos neuropeptid-tartalom többletfunkciókat biztosít a peptiderg érző neuronoknak (6. ábra; a referenciákat illetően lásd Szolcsányi, 2014). Adekvát inger vagy antidrómos elektromos ingerlés hatására – a fent említett afferens funkcióval párhuzamosan – a vezikulákban tárolt neuropeptidek exocytosis révén felszabadulnak az extracelluláris térbe. Ennek a folyamatnak a kiváltásához az intracelluláris Ca^{2+} -szint megemelkedése szükséges. A felszabaduló neuropeptidek parakrin mediátorokként hatva az idegvégződés közelében különféle szöveti válaszokat hoznak létre: az SP főleg plazma-extravazációt, a CGRP vazodilatációt, az NKA a nem vaszkuláris simaizomzat kontrakcióját, a CGRP annak relaxációját; mindezen hatások együttesen képezik az idegvégződés **lokális, efferens funkcióját**. Az első két válasz együttesen a neurogén gyulladás fogalmával foglalható össze, míg az utóbbiak a nem-adrenerg, nem kolinerg (NANC) visceromotoros válaszok egyik altípusát képviselik. Érdekes, hogy antidrómos elektromos ingerlés esetén a neuropeptid-felszabaduláshoz alacsonyabb frekvencia szükséges, mint ahhoz, hogy fájdalomérzet alakuljon ki. Ez arra utal, hogy e funkció élettanilag legalább annyira releváns, mint az afferens. A neuropeptid-felszabadulás radio- vagy enzimimmunesszé segítségével történő mérése érzékeny módszer a peptiderg nociceptív idegvégzódések aktivitásának vizsgálatára.

A peptiderg nociceptorok harmadik funkciója egy **távoli, szisztémás hatás**, amelyet Pintér és Szolcsányi írt le különféle kísérletes elrendezésekben. Altatott patkányokban és tengerimalacokban a hátsó gyökök, a n. ischiadicus vagy a n. vagus antidrómos elektromos ingerlése, illetve a bőr nociceptorainak fájdalomkeltő irritánsokkal való kémiai ingerlése gátolta a test távoli területein a mustárolajjal, dextránnal vagy carrageninnel kiváltott gyulladásos reakciót (a referenciákat illetően lásd Pintér *et al.*, 2006; Szolcsányi *et al.*, 2011). Ezeket a távoli gyulladásgátló hatásokat csökkentette a szomatosztatin receptorantagonistája, depletáló ágense vagy az ellene termelt poliklonális antitest. A távoli gyulladásgátló hatás a plazma szomatosztatinszintjének emelkedésével járt együtt. Továbbá azt is kimutatták, hogy a kapszaicin képes szomatosztatint felszabadítani patkány izolált tracheájából (Németh *et al.*, 1998). Mindezek alapján arra lehetett következtetni, hogy a távoli gyulladásgátló hatást a

perifériás nociceptorokból felszabaduló és a szisztémás keringésbe bejutó szomatosztatin közvetíti (Szolcsányi *et al.*, 2004; 2011). Az érző neuronokból származó szomatosztatin szisztémás, hormonszerű működése alapján javasolta Szolcsányi (2004) a harmadik funkció elnevezéseként a „szenzokrin” jelzőt. Hisztokémiai adatok arra utalnak, hogy a szomatosztatin – ellentétben a többi szenzoros neuropeptiddel – patkány és ember bőrében mélyebben, az epidermis alatti érplexus körül levő rostokban található (Dalsgaard *et al.*, 1989; Dux *et al.*, 1999). Ez magyarázhatja, hogy miért csak ez a neuropeptid szívódik fel olyan mértékben a keringésbe, hogy távoli hatásokat tudjon kifejteni.



6. ábra. A peptiderg polimodális nociceptorok hármas funkciójának sémája. A rövidítések magyarázatát lásd a szövegben.

1.6. Bradikinin és prosztaglandinok: a polimodális nociceptorokat hővel szemben szenzibilizáló gyulladásos mediátorok prototípusai

Számos endogén mediátor képes a polimodális nociceptorokat aktiválni, illetve szenzibilizálni: bradikinin, prosztaglandinok (PGE_2 , PGI_2), lipoxigenáz-termékek (LTB_4 , LTD_4), szerotonin, ATP, adenzin, citokinek (pl. $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$), nitrogén-monoxid stb. (Dray, 1994; Pethő és Reeh, 2012). **Aktiváción** az értendő, hogy a nociceptív idegvégződésben a receptorpotenciálok térbeli és időbeli szummációjára alapján olyan mértékű depolarizáció jön létre, amely a feszültségfüggő Na^+ -csatornák aktivációs küszöbét meghaladva tovaterjedő akcióspotenciál-sorozat kialakulását eredményezi. A nociceptorok **szenzibilizációja** azt jelenti, hogy egy adott kémiai vagy fizikai (pl. termális) inger fokozza az idegvégződésnek egy másik

ingerrel szembeni válaszkészségét. A sok endogén ágens közül a legrészletesebben a bradikinin és a prosztaglandinokat vizsgálták a nociceptorok hővel szembeni szenzibilizációjának vonatkozásában mind *in vitro*, mind *in vivo* (Kumazawa *et al.*, 1991; Khan *et al.*, 1992; Koltzenburg *et al.*, 1992a; Cesare és McNaughton, 1996; Vyklicky *et al.*, 1999; a további részleteket illetően lásd Pethő és Reeh, 2012).

A **bradikinin** tartós vagy ismételt alkalmazása esetén a nociceptor-aktiváló hatása jelentős tachyphylaxiát mutat, ami megkérdőjelezi ezen hatás jelentőségét a gyulladásos fájdalom fenntartásában (Kumazawa *et al.*, 1987; Lang *et al.*, 1990; Liang *et al.*, 2001). Ezzel ellentétben a bradikinin hőszenszibilizáló hatása mentesnek mutatkozott a tachyphylaxiától a patkánybőr-n. saphenus preparátumban, *in vitro* (Liang *et al.*, 2001), felértékelve ezt a hatást a gyulladásos fájdalom szempontjából. A bradikinin jelátviteli folyamatai igen sokrétűek, de konszenzus van abban a tekintetben, hogy a **G_q-protein-PLCβ-DAG-PKC tengely** aktiválása központi szerepet játszik (a részleteket illetően lásd Pethő és Reeh, 2012). Az egyéb mechanizmusok közül – számos hatás esetében – bizonyítottan fontos a PLA₂ aktiválása, ezáltal eikozanoidok, köztük prosztaglandinok képződése.

A **prosztaglandinok** (PG-ok) számos bradikininhatás közvetítésében vesznek részt (Dray *et al.*, 1992; Rueff és Dray, 1993; Schuligoi *et al.*, 1994; Weinreich *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 1999; Maubach és Grundy, 1999). A PGE₂ és PGI₂ régóta ismert gyulladásos mediátorok, amelyek az akut gyulladásos reakció vaszkuláris (értágulat, plazma-extravazáció) és neurális komponenseinek (hő-, mechanikai és kémiai hiperalgécia) kialakításában fontos szerepet játszanak. Nociceptor-szenzibilizáló tulajdonságukat számos *in vitro* és *in vivo* modellben dokumentálták (Mizumura *et al.*, 1987; 1993a; Schaible és Schmidt, 1988; Taiwo és Levine, 1990; Birrell *et al.*, 1993; Rueff és Dray, 1993). A szenzibilizációt közvetítő fő szignáltranszdukciós út a **G_s-protein-adenil-cikláz-cAMP-PKA tengely** aktiválása (Mizumura *et al.*, 1993b; Cui és Nicol, 1995; Hingtgen *et al.*, 1995; Kress *et al.*, 1996; Lopshire és Nicol, 1998; Smith *et al.*, 2000). A PGE₂ és PGI₂ képesek hővel szemben szenzibilizálni a perifériás nociceptorokat (Mizumura *et al.*, 1987; 1993a; Rueff és Dray, 1993; Evans *et al.*, 1999).

E két mediátort összekapcsolja az a jellegzetes tulajdonság is, hogy mindkettő képes a TRPV1 aktiválására anélkül, hogy kapcsolódna ahhoz (Sugiura *et al.*, 2002; Moriyama *et al.*, 2005). Amint arról az 1.4.1.2. pontokban szó volt, a bradikinin, illetve a prosztaglandinok fent említett jelátviteli folyamatai során aktiválódó PKC, illetve a PKA foszforiláció révén szenzibilizálja/aktiválja a TRPV1-et. Ezen mechanizmus alapján e mediátorok – több másához hasonlóan – a TRPV1-receptor „indirekt agonistáinak” tekinthetők.

2. ELŐZMÉNYEK, ÁLTALÁNOS CÉLKITŰZÉSEK, AZ ÉRTEKEZÉS LOGIKAI STRUKTÚRÁJA

Kutatói pályám kezdetétől fogva a primer afferens neuronok perifériás végződéseinek élettani és farmakológiai aspektusaival foglalkoztam Szolcsányi professzor munkacsoportjában, ily módon a nocicepció perifériás mechanizmusainak vizsgálata „imprinting”-szerűen meghatározta kutatói attitűdömet. A nociceptív elsődleges érző neuronok perifériás végződéseinek fájdalomkeltő ingerek hatására aktiválódnak; ennek megfelelően funkciójuk megismerése nélkülözhetetlen a fájdalomkutatás számára. Azonban ezek a terminálisok kicsiny méretüknél fogva nem vizsgálhatók közvetlen módon sem biokémiaileg, sem elektrofiziológiailag. Emiatt a nociceptorokban végbemenő jelátviteli folyamatok, illetve membrán-ionáramok (receptorpotenciál) közvetlenül nem analizálhatók. Ennek a problémának a kiküszöbölésére a nociceptív elsődleges érző neuronok sejttestén végeznek vizsgálatokat abból a hallgatólágos feltételezésből kiindulva, hogy az itt zajló elektrofiziológiai és biokémiai folyamatok azonosak azokkal, amelyek a perifériás végződésben zajlanak. Azonban ma már tudjuk, hogy a sejttest nem tökéletes modellje a perifériás végződésnek: pl. utóbbiban nincs endoplazmás retikulum; vagyis a sejttestben kimutatott, IP_3 -mal kiváltott Ca^{2+} -felszabadulás nem releváns a perifériás terminálisra vonatkozóan. Korábbi, szisztémásan adott kapszaicinnal végzett vizsgálataink szerint a perifériás terminális a centrálissal egyenrangú támadáspont, ellenben az axonnal (Pethő és Szolcsányi, 1996). Ennek ellenére ma is a kémiai mediátorok, illetve fizikai (pl. termális) ingerek szenzoros neuronra kifejtett hatásairól szerzett információink zömét a sejttesten, és nem a perifériás végződésen nyert adatok képezik. Ezt némiképp kompenzálendő, a „Physiological Reviews” c. folyóirat számára írt felkért közleményünkben – amelyben összefoglaltuk a bradikinin, prosztanoidok, leukotriének és nitrogén-monoxid hatásait a nociceptorokra –, tudomásunk szerint első alkalommal emeltük ki azokat a receptorokat és jelátviteli mechanizmusokat, amelyek működésére a nociceptív szenzoros neuronok perifériás végződésében (is) van bizonyíték, és amelyek így periférián ható analgetikum fejlesztése szempontjából ígéretesek (Pethő és Reeh, 2012).

Némiképp hasonló a helyzet a rendelkezésre álló fájdalomcsillapítóinkkal: a szerek vagy a központi idegrendszerben hatnak (ópíoidok) vagy a perifériás szövetekben, illetve a gerincvelőben gátolják a nociceptív elsődleges érző neuronokat érzékenyítő prosztanoidok szintézisét (NSAID-ok). Nincs azonban olyan szisztémásan adott fájdalomcsillapítónk, amelyik a legkézenfekvőbb hatásmódnak megfelelően a perifériás nociceptorokat blokkolná. 2009 óta használatos azonban a 8% kapszaicint tartalmazó dermális tapasz, amelyik 60 perces

kontaktusidő után perifériásan, az epidermális és dermális nociceptív terminálisokra hatva fejt ki hónapokig tartó analgetikus hatást számottevő mellékhatások nélkül a neuropátiás fájdalom különböző formáiban, amelyek patogenezisében dominánsan központi idegrendszeri mechanizmusokat tételeznek fel. Eklatáns példa e készítmény hatékonysága fantomfájdalomban (Privitera *et al.*, 2017), amelynél a döntően centrális patogenezis kézenfekvő. Mindezek a tények felértékelik azokat a vizsgálatokat, amelyek a perifériás nociceptorok funkciójáról adnak információt. Ilyen az akciós potenciálok elvezetése nociceptív afferensekről, a nociceptorokból felszabaduló neuropeptidek mérése perifériás szövetekben vagy magatartási kísérletekben a nociceptorközelin (pl. intraplantárisan) adott tesztágenssel nyert válaszok analízise. A jelen értekezés alapját képező közlemények zöme ilyen módszerekkel nyert eredményeken alapul.

Kísérleteink elsődleges célja a termonocicepció vizsgálata volt annak érdekében, hogy olyan célpontokat és mechanizmusokat azonosítsunk a perifériás nociceptorokban, amelyek farmakológiai befolyásolása új típusú, perifériás támadáspontú és ezáltal kevesebb mellékhatással bíró analgetikumok kifejlesztéséhez vezethet. A jelen disszertáció alapját képező 16 közlemény három logikai egységbe sorolható. Az elsőbe 4 olyan vizsgálat tartozik, amelyek célja az volt, hogy *in vitro* rendszerben vizsgáljam a perifériás nociceptorok forró ingerre adott válaszát, illetve annak szenzibilizációját. Az egyrost-elvezetési elektrofiziológiai és a neuropeptid-felszabadulás mérését alkalmazó neurokémiai kísérletek egyik célja a bradikinin és a prosztaglandinok termális nociceptor-szenzibilizáló hatásának analízise volt. A másik cél a TRPV1 szerepének vizsgálata volt a forró ingerrel kiváltott bőrbeli neuropeptid-felszabadulásban. A második egységbe 5 olyan közlemény anyaga került, amelyek célja egy komplex metodikai fejlesztés volt: az (elfeledett) magatartási nociceptív hőküszöböt éber patkányban, illetve egérben mérő készülékek kifejlesztése és az azokra kidolgozott allodynia-modellek validálása, ennek részeként konvencionális és új, perifériás támadáspontú, potenciális analgetikumok vizsgálata. A harmadik egységbe (7 közlemény) olyan *in vivo* kísérletek kerültek, amelyek célja a termonocicepció mechanizmusának vizsgálata volt normál, szenzibilizált és deszenzibilizált állapotban a hőküszöbmérés mint érzékeny módszer alkalmazásával.

3. IN VITRO VIZSGÁLATOK A NOCICEPTOROK FORRÓ INGERRE ADOTT VÁLASZÁVAL ÉS ANNAK SZENZIBILIZÁCIÓJÁVAL KAPCSOLATBAN

3.1. Módszerek

Egyrost-elvezetés („single-unit recording”) C polimodális nociceptorokról patkány lábháti bőr–n. saphenus preparátumon in vitro

240–350 grammos hím Wistar patkányokat 100% szén-dioxidot tartalmazó légtérbe helyezve elöltünk, majd a hátsó végtag lábháti részéről a bőrt leválasztottuk a n. saphenussal együtt. A bőrlebenyt szervfürdőbe (Reeh, 1986) helyeztük az irharéteggel fölfelé, és 32 °C-on szintetikus intersticiális folyadékkal (SIF, Bretag, 1969) superfundáltuk (16 ml/perc) carbogen gázkerékkel (95% O₂, 5% CO₂) történő buborékolatás mellett, ami 7,38-as pH-t eredményezett. Az idegtörzset egy lyukon keresztül áthúztuk a szomszédos elvezető kamrába, ahol egy tűkörfelülettel ellátott vízszintes platformra helyeztük és paraffinolajjal fedtük le. Az idegtörzsről visszahúzással eltávolítottuk a perineuriumot, majd hegyesített óráscsipesszel vékony filamentumokra osztottuk. A filamentumot aranyhuzalból készült elvezető elektródra helyeztük, és az idegi aktivitást AC-erősítő, utóerősítő alkalmazásával oszcilloszkópon (Tektronix TDA 210) jelenítettük meg, valamint hangszóróra is kiveztük. Az idegtörzson tűelektródot vezettünk át, amelynek csúcsát a szervfürdő fenekébe rögzítettük. Ezen keresztüli elektromos ingerlést alkalmaztunk annak eldöntésére, hogy nulla, egy vagy annál több működőképes idegrost van a filamentumban. A filamentum részekre történő szeparálását mindaddig folytattuk, amíg csak – ideálisan egy vagy – maximum három működőképes axon nem maradt benne. Tompa végű üvegrudat használtunk a „unit”-ok receptív területének azonosítására. A vezetési sebesség meghatározásához teflonbevonatú mikroneurográfias acélelektrodot (5–10 µm átmérőjű) illesztettünk a receptív terület közepébe.

A receptív terület mechanikai ingerlésére von Frey-szalakat használtunk (1–256 mN). A forró, a hideg és a kémiai aktiválhatóság tesztelése előtt fémhengert helyeztünk a receptív területre, amelyik kiemelkedett a superfundáló folyadékból. Ezután tüvel ellátott fecskendő segítségével a hengerből kiszívtuk a folyadékot. A forró ingerrel való tesztelés során az átlátszó szervfürdő alatt levő halogén égő fényét fókuszáltuk a receptív területen levő henger közepére, amelynek segítségével a bőr corium felőli oldalán a hőmérsékletet 20 s alatt 32-ről 46 °C-ra növeltük, ami az epidermális oldalon 32-ről 52 °C-ra való felmelegítésnek felel meg (Reeh, 1986). A hideggel történő ingerléshez 4 °C-os SIF-fel töltöttük meg a hengert, ami 7 °C-os

hőmérsékletet eredményezett a bőr coriális felszínén. A kémiai ingerléshez az evakuált hengert az adott vegyület 32 °C-os oldatával perfundáltuk (3 ml/perc).

Az elektrofiziológiai adatok feldolgozása

Az elektróddal elvezetett elektromos jelet 12-bites AD-konverterrel digitalizáltuk, és DAP 1200-as interfész-kártyán (Microstar, Redmond, USA) keresztül számítógépbe vezettük. A Spike/Spidi szoftver (Forster és Handwerker, 1990) segítségével történt az akciós potenciálok megkülönböztetése és off-line analízise. A vezetési sebességet az idegtörzsben levő ingerlő elektróddal kiváltott akciós potenciál receptív területben történő megjelenésének késése és a két hely távolsága alapján számítottuk. Forró ingerre érzékenynek akkor minősítettük a rostot, ha a termális ingerlésre legalább két akciós potenciállal válaszolt; hőküszöbnek a második akciós potenciál idején fennálló coriumhőmérsékletet tekintettük. A hőválasz nagyságát a 20 másodperces ingerlési periódus alatt kialakuló akciós potenciálok számával jellemeztük. Az esetleges spontán aktivitást kivontuk ebből az értékből. A bradikinin hőválaszt fokozó hatását az alábbi képlet segítségével adtuk meg százalékosan: $[100 \times (SHB - SH) / SH]$, ahol SH a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok száma a bradikinin adás előtt, SHB pedig ezen érték az után.

Az immunreaktív CGRP felszabadulásának mérése patkány vagy egér lábháti bőrből enzimimmunesszé segítségével

Kísérleteink előtt nem sokkal dolgoztak ki egy *in vitro* modellt, amelyben a forró ingerekkel kiváltott immunoreaktív (i) CGRP-felszabadulást lehet mérni izolált patkánybőrből enzimimmunesszé (EIA) segítségével (Kessler *et al.*, 1999). 40–100 grammos hím Wistar patkányokat 100% szén-dioxidot tartalmazó légtérbe helyezve előltünk, majd mindkét hátsó végtag lábháti részéről térdtől lefelé a bőrt leválasztottuk a nagyobb erek és idegek megkímélésével. A nyert bőrlebenyeket (0,13–0,35 g) 6 mm átmérőjű műanyag rudakra tekertük rá a corium felőli résszel kifelé, 3.0-ás fonállal rögzítettük, majd a rúdon levő bőrlebenyt 95% oxigént és 5% szén-dioxidot tartalmazó gázkeverékkel buborékolatott SIF-ben mostuk 32 °C hőmérsékleten 30 percen át. Öt üvegcső mindegyikébe 1,3 ml SIF-et mértünk, és ezeket 32 °C-on temperált rázófürdőbe helyeztük. A kísérleti protokoll azzal kezdődött, hogy a bőrlebenyt hordozó üvegrudat az első üvegcsőbe tettük 5 percre. Ezután áttettük a 2-es csőbe, szintén 5 percre, majd ezt így folytattuk a másik három cső esetében is. Hőstimuláció céljából a harmadik csövet egy másik temperált vízfürdőben 45 vagy 47 °C-on tartottuk 5 percig. Az alacsony pH-val (5,7) történő izgatás szintén a harmadik periódusban történt olyan módosított SIF-fel, amelyben

a bikarbonátot foszfátpufferre cseréltük carbogénes buborékolatás mellett (Steen *et al.*, 1992, 1995; Sauer *et al.*, 1998). Kapszaicinnel vagy magas koncentrációjú K^+ -ionnal való stimulációt szintén a 3. csőben alkalmaztunk. A flurbiprofent már a kimosási periódusban (30 perc) és mind az öt 5-perces periódusban alkalmaztuk. A különféle szerek hatását intraindividuálisan vizsgáltuk: a 2., 3. és 4. periódusban a jobb végtagokból származó bőrlebenyeket a vizsgált szerrel kezeltük, míg a bal végtagokból valókat SIF-fel. Limitált számú kísérletben vad típusú és TRPV1-génhiányos (a tenyészpárokat John B. Davis, GlaxoSmithKline, Harlow, UK ajándékozta) egerek hátsó lábának bőrlebenyeit használtuk, azzal a különbséggel, hogy a preparátum kisebb mérete miatt a csövek csak 1 ml folyadékot tartalmaztak. Minden eluátumból 200 μ l-t azonnal összekevertünk 50 μ l 5-szörösen koncentrált CGRP EIA pufferrel, amely számos peptidázgátlót tartalmazott. A CGRP koncentrációját EIA kit (Cayman, SPIbio, Franciaország által forgalmazott) és mikrolemes-olvasó (Dynatech, USA) segítségével határoztuk meg. Az inkubációs folyadékban meghatározott iCGRP mennyiségét elosztottuk a bőrlebeny nedves tömegével, és normalizált formában, pg/g egységben adtuk meg. A stimulált iCGRP felszabadulást befolyásoló szerek hatásának analizéséhez egy kumulatív értéket („kvázi-AUC”) számítottunk a 3. és 4. periódusra vonatkozóan a bazális felszabadulás értékével korrigálva az alábbi képlet segítségével: $(S_3 + S_4) - 2 \times S_2$, ahol S az adott számú mintában levő iCGRP mennyiségét jelenti.

Anyagok

A bradikinin (Sigma, Németország), mindkét flurbiprofen enantiomert (Prof. G. Geisslinger, University of Frankfurt/Main ajándéka) és a PGI_2 -t (Biomol, Németország) desztillált vízben, a PGE_2 -t (Biomol) 1,4% etanolt tartalmazó desztillált vízben oldottuk fel 1 mM-os törzsoldatként. A racém flurbiprofent (Prof. G. Geisslinger, University of Frankfurt/Main ajándéka) desztillált vízben oldottuk fel 1 mM-os törzsoldat formájában. A forskolint (Tocris, UK) és a forbol-12-mirisztát-13-acetátot (PMA, Calbiochem, Bad Soden, Németország) 98%-os etanolban oldottuk (10 mM-os törzsoldatok). Az ionomycint (Sigma/Aldrich, Németország) dimetil-szulfoxidban (DMSO, 1 mM-os törzsoldat) oldottuk fel. A kapszaicint (Sigma/Aldrich) 98%-os etanolban oldottuk fel 1 mM-os törzsoldatot képezve. A ruténiumvöröset (Sigma/Aldrich) SIF-ben oldottuk 1 mM-os törzsoldatként. A capsazepint (Sigma/Aldrich) 98%-os etanolban oldottuk ultrahangos rázást követően 10 mM-os törzsoldatot képezve. Minden törzsoldatot SIF-fel hígítottunk. Magas koncentrációjú K^+ -iont tartalmazó oldat nyérése céljából módosított SIF-et használtunk: a KCl-koncentrációt 60 mM-ra növeltük, és az ozmolaritás szinten tartásához a szacharózt elhagytuk, valamint a NaCl-koncentrációt lecsökkentettük.

3.2. A ciklooxygenáz-termékek szerepe a bradikinin hőszenzibilizáló hatásában izolált patkánybőr polimodális nociceptoraiban

3.2.1. Előzmények és célkitűzés

Ismert, hogy a prosztaglandinok számos bradikininhatás közvetítésében vesznek részt (Dray *et al.*, 1992; Rueff és Dray, 1993; Weinreich *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 1999; Maubach és Grundy, 1999). Példa erre, hogy a bradikinin termális hiperalgéziát kiváltó hatását a szisztémásan adott ciklooxygenáz (COX) -inhibitor indomethacin gátolta, felvetve a prosztaglandinok mediátor szerepét a perifériás nociceptor-szenzibilizációban (Schuligoi *et al.*, 1994). Azonban a COX-gátlók antinociceptív hatásainál a centrális (pl. spinális) komponens nem zárható ki (Malmberg és Yaksh, 1994; McCormack, 1994; Geisslinger *et al.*, 2000), és az is ismert, hogy számos NSAID a COX-gátláson kívül egyéb antinociceptív hatásmechanizmussal is rendelkezik (Brune *et al.*, 1991; Geisslinger *et al.*, 1993; Malmberg és Yaksh, 1994; Geisslinger *et al.*, 2000). Mindezek alapján a prosztaglandinok szerepe a bradikinin perifériás, termális nociceptor-szenzibilizáló hatásában valószínűsíthető, de nem igazolt.

Célunk annak eldöntése volt, hogy a bradikinin termális nociceptor-szenzibilizáló hatásában szerepet játszanak-e COX-termékek (elsősorban prosztaglandinok) az izolált patkánybőr–n. saphenus preparátumban vizsgálva. Ehhez a flurbiprofen – egy királis szerkezetű, a COX-1-et és COX-2-t egyaránt gátló NSAID – két enantiomerjét használtuk, amelyek közül az S(+)-flurbiprofen kb. 500-szor potensebb, mint az R(–)-flurbiprofen (Brune *et al.*, 1991; Peskar *et al.*, 1991; Geisslinger *et al.*, 2000), jelezve hogy ez az aktív izomer a COX-gátlás szempontjából. Patkányban a flurbiprofen racemizálódása kisebb, mint 2% (Knihinicki *et al.*, 1989; Menzel-Soglowek *et al.*, 1992). A szert ezen tulajdonságai különösen alkalmassá teszik annak eldöntésére, hogy egy adott hatásban a COX-termékek szerepet játszanak-e.

3.2.2. Eredmények

A vizsgált rostpopuláció jellegzetességei

A kísérletekben csak C polimodális (C-MH) nociceptorokat vizsgáltunk, amelyek vezetési sebessége kisebb volt 1 m/s-nál, reagáltak mechanikai ingerre (ez alapján történt a receptív terület azonosítása), forró ingerre, de nem a hidegingerlésre. Összesen 38 olyan C-MH rostot vizsgáltunk, amelyek bradikinin hatására legalább 50%-os hőválasz-növekedést mutattak. Ezek mindegyikében a bradikinin tüzelést okozott alkalmazásának ideje alatt (217 ± 33 akciós potenciál per 5 min). A vezetési sebességek 0,2 és 0,95 m/s között voltak, a mechanikai küszöb

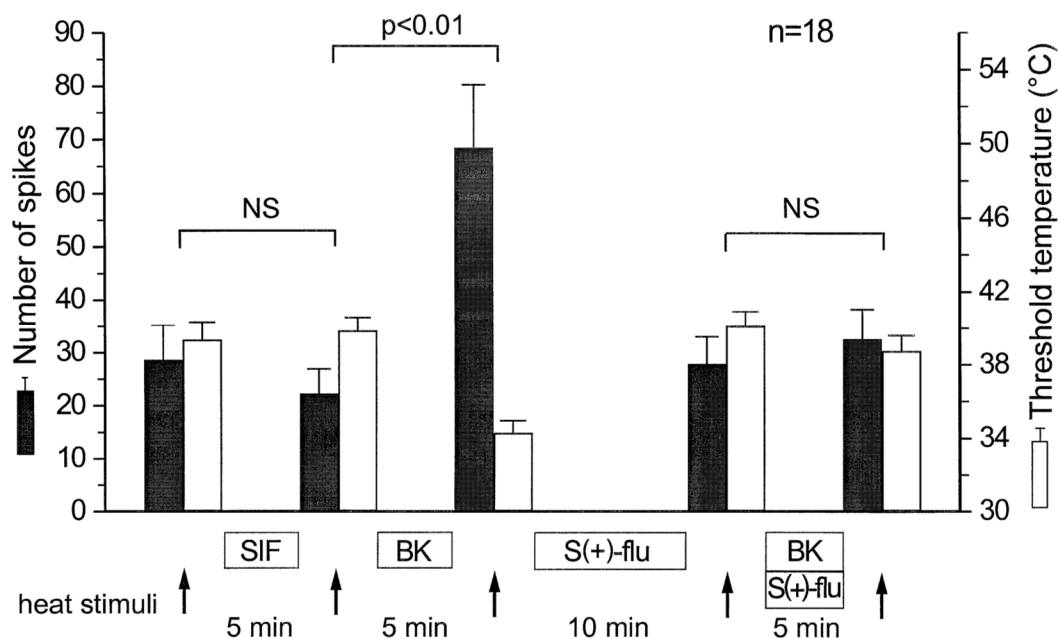
16 és 256 mN között mozgott. A hőküszöb 37,1 és 45,6 °C közötti érték volt. Egyetlen vizsgált rost sem reagált hideg ingerre.

Az ismételt bradikinin-expozíció hatása a rostok hőválaszára

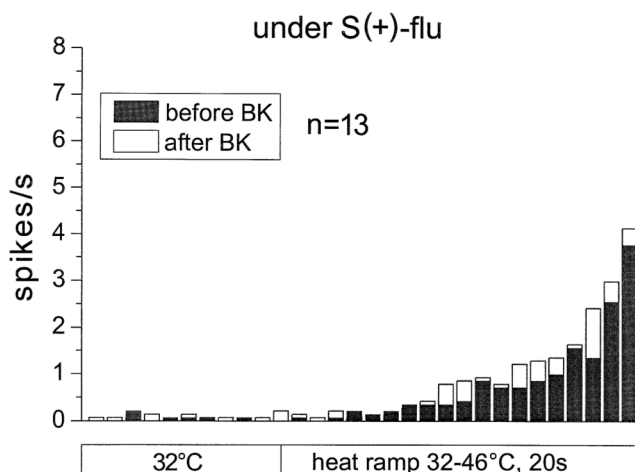
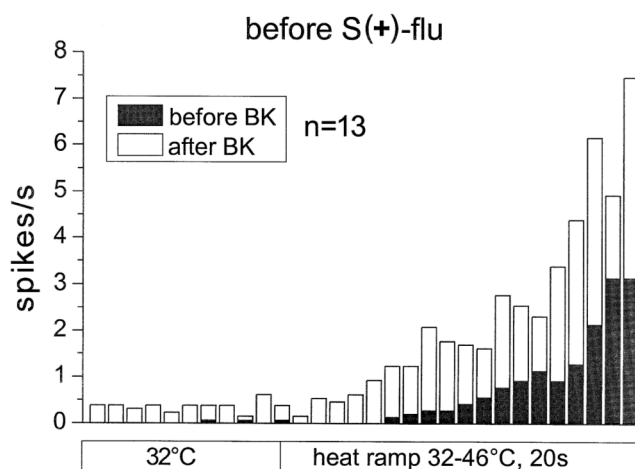
Bár egy korábbi vizsgálat (Liang *et al.*, 2001) ugyanezen a preparátumon kimutatta, hogy a bradikinin hőszenzibilizáló hatása rövid ideig tart és nem mutat tachyphylaxiát, 6 roston újra megvizsgáltuk ezeket a – jelen analízis szempontjából kritikus fontosságú – jellegzetességeket: a bradikininexpozíció előtt és után hőingerlést végeztünk, 10 percig tartó SIF-adás után mindezt megismételtük. Az első és a 10 perc múlva ismételt bradikininadás (10 μ M, 5 perc) előtti hőválasz nagysága nem mutatott szignifikáns eltérést ($9,7 \pm 4,1$ versus $11,2 \pm 4,5$ akciós potenciál), jelezve, hogy a szenzibilizáció 10 percen belül teljesen lezajlik. Az első bradikininadás hatására a hőválasz $138 \pm 37\%$ -kal nőtt, míg a 10 perc múlva ismételt expozíció hatására $127 \pm 59\%$ -kal; a két növekmény közötti eltérés nem szignifikáns (**12. ábra, jobb oldali panel**), jelezve a tachyphylaxia hiányát.

Az S(+)-flurbiprofen hatása a bradikinnel kiváltott hőszenzibilizációra és a kívülről adott prosztaglandinok hatása az S(+)-flurbiprofen gátló hatására

Az S(+)-flurbiprofen hatását 18 roston vizsgáltuk. A szer adását megelőzően a bradikinin (10 μ M, 5 perc) jelentős hőszenzibilizációt váltott ki: szignifikánsan megnövelte a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok számát ($22,3 \pm 4,6$ -ról $68,6 \pm 11,7$ -re, $p < 0,01$, Wilcoxon-teszt és Student-féle egymintás t-próba), és ugyancsak szignifikánsan lecsökkentette az aktivációs hőküszöböt ($39,9 \pm 0,7$ -ről $34,3 \pm 0,7$ °C-ra, $p < 0,01$, Wilcoxon-teszt és Student-féle egymintás t-próba) (**7. ábra**). A bradikinin szenzibilizáló hatása a rostok átlagolt hőválasza alapján is egyértelmű: a hőstimulus minden másodpercben magasabb volt a tüskekiszülések száma és a maximális kiszülési frekvencia is szignifikánsan megnőtt (**8. ábra, felső panel**). A receptív terület S(+)-flurbiprofennel történő szuperfúziója (1 μ M, 10 perc) kivédte a bradikinin hőszenzibilizáló hatását: a peptid sem a hőválasz nagyságát nem tudta szignifikánsan megnövelni ($27,9 \pm 5,2$ versus $32,6 \pm 5,6$), sem pedig a hőküszöböt nem tudta szignifikánsan lecsökkenteni ($40,2 \pm 0,8$ versus $38,8 \pm 0,9$). (**7. ábra**). A szenzibilizáció hiánya a rostok átlagolt hőválasza alapján is egyértelmű volt (**8. ábra, alsó panel**). Az S(+)-flurbiprofen közel komplett gátló hatása jól demonstrálható a hőválasz bradikinin okozta növekedésének százalékos értékével is ($275 \pm 45\%$ versus $32 \pm 14\%$, $p < 0,01$, Wilcoxon-teszt és Student-féle egymintás t-próba) (**12. ábra, bal oldali panel**). Hasonló tendencia volt megfigyelhető a hőküszöbcsökkenés vonatkozásában is: $5,6 \pm 0,8$ versus $1,4 \pm 0,8$ °C ($p < 0,01$, Wilcoxon-teszt és Student-féle egymintás t-próba). Megjegyzendő,



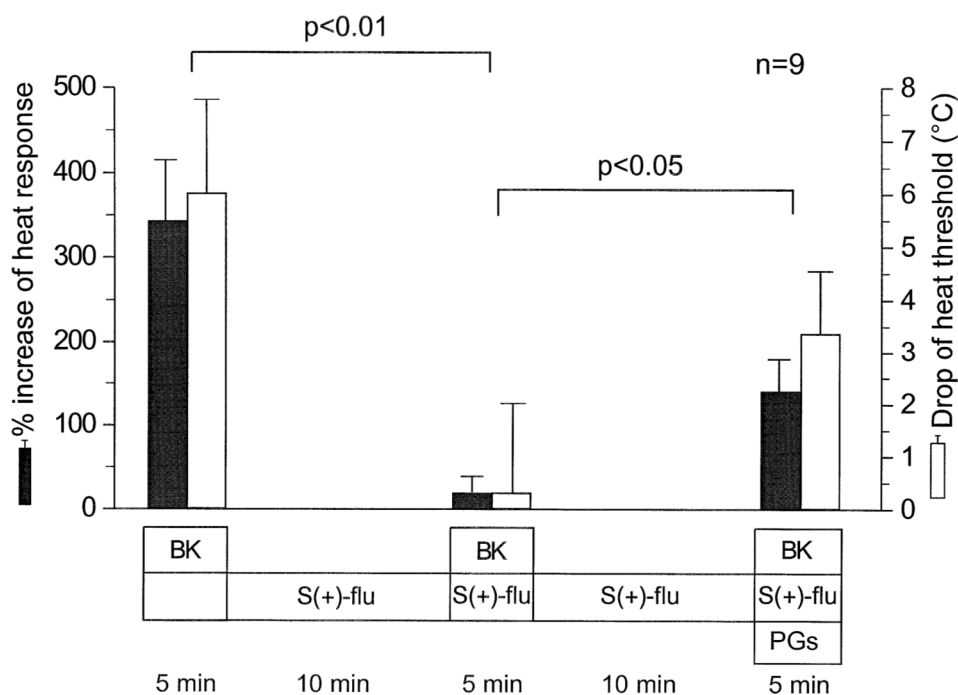
7. ábra. Az S(+)-flurbiprofen [S(+)-flu, 1 μ M] hatása a bradikinnel (BK, 10 μ M) kiváltott hőszensibilizációra. A nyílak hőingerlést jelentenek, az oszlopok átlag \pm SEM. A fekete oszlopok a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok számát jelentik (bal oldali függőleges tengely), az üres oszlopok a hőküszöböt mutatják (jobb oldali függőleges tengely); a kapcsos zárójelek a statisztikai összehasonlításokat (Wilcoxon-teszt és Student-féle egymintás t-próba) mutatják, és egyaránt vonatkoznak mindkét (fekete és üres) oszloppárra. NS: statisztikailag nem szignifikáns.



8. ábra. A C-MH rostok átlagolt hőválasza bradikinin (BK, 10 μ M, 5 perc) adása előtt (fekete oszlopok) és után (üres oszlopok) az S(+)-flurbiprofen [S(+)-flu, 1 μ M, 15 perc] hiányában és jelenlétében.

hogy a nem szenzibilizált hőválaszt nem gátolta az S(+)-flurbiprofen: az első és az S(+)-flurbiprofen-szuperfúziót követő második bradikininadás előtti hőválasz között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség sem az akciós potenciálok számában, sem a hőküszöbben (7. ábra).

A kívülről adott prosztaglandinok hatását az S(+)-flurbiprofen okozta gátlásra 9 roston vizsgáltuk. Az S(+)-flurbiprofen ebben a rostpopulációban is blokkolta a bradikinin hőszenzibilizáló hatását mind a hőválasz nagyságának (százalékos) növekedését (343 ± 72 versus $20 \pm 19\%$), mind a hőküszöbcsökkenést ($6 \pm 1,7$ versus $0,3 \pm 1,7$ °C) illetően (9. ábra). A bradikininrel együtt adott PGE₂ és PGI₂ keveréke (mindkettő 10 µM) részlegesen helyreállította a bradikinin hőszenzibilizáló hatását (9. ábra): az akciós potenciálok számának növekedése $141 \pm 38\%$ volt, a küszöbcsökkenés $3,4 \pm 1,2$ °C. A fenti adatok alapján a prosztaglandinok a hőválasz-növekedést 43 ± 12 , a hőküszöbcsökkenést $40 \pm 19\%$ -ban tudták helyreállítani (12. ábra).



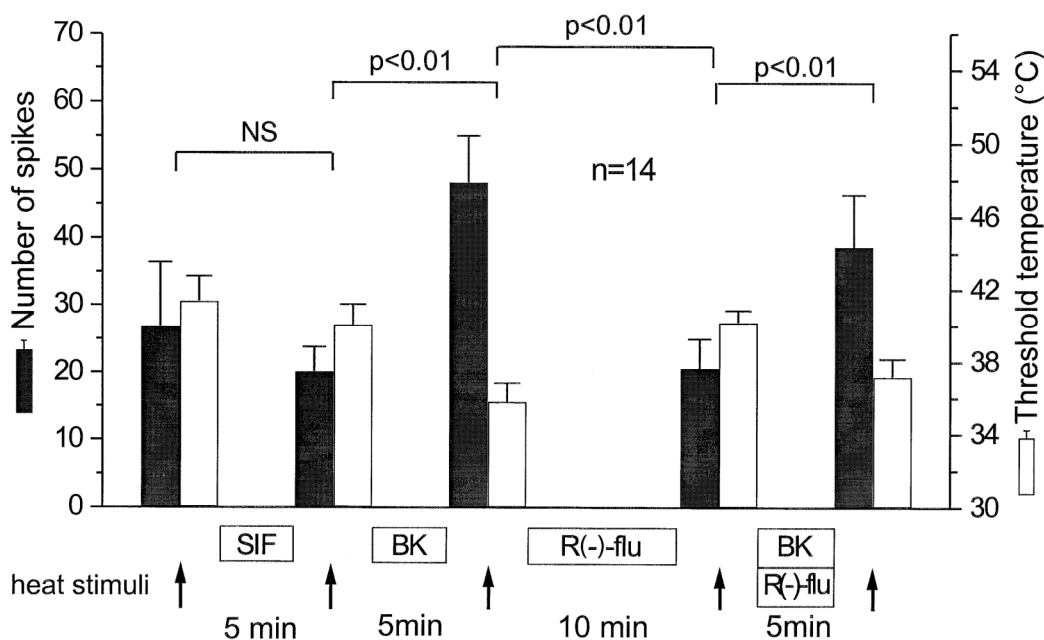
9. ábra. A kívülről adott prosztaglandinok (PGs, PGE₂ és PGI₂, mindkettő 10 µM) hatása a bradikininrel (BK, 10 µM) kiváltott hőszenzibilizáció S(+)-flurbiprofen [S(+)-flu, 1 µM] általi gátlására. Az oszlopok átlag±SEM. A fekete oszlopok a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok számának százalékos növekedését jelentik (bal oldali függőleges tengely), az üres oszlopok a hőküszöbcsökkenést mutatják (jobb oldali függőleges tengely); a kapcsolós zárójel a statisztikai összehasonlításokat (Wilcoxon-teszt és Student-féle egymintás t-próba) mutatják, és egyaránt vonatkoznak mindkét (fekete és üres) oszloppárra.

Az R(-)-flurbiprofen hatása a bradikininrel kiváltott hőszenzibilizációra

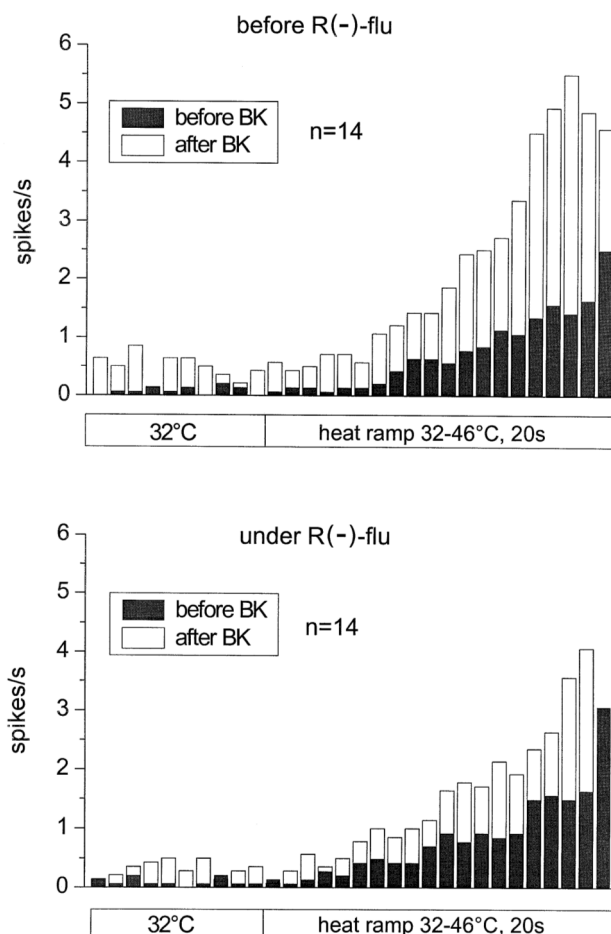
Az R(-)-flurbiprofen hatását 14 roston vizsgáltuk. Az R(-)-flurbiprofen adását megelőzően a bradikinin (10 µM, 5 perc) jelentős hőszenzibilizációt váltott ki: szignifikánsan megnövelte a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok számát ($20,1 \pm 3,6$ -ről $48,1 \pm 6,9$ -re,

$p < 0,01$, Wilcoxon-teszt és Student-féle egymintás t-próba) és ugyancsak szignifikánsan lecsökkentette a hőküszöböt ($40,1 \pm 1,1$ -ről $35,8 \pm 1,0$ °C-ra, $p < 0,01$, Wilcoxon-teszt és Student-féle egymintás t-próba) (**10. ábra**). A bradikinin szenzibilizáló hatása a rostok átlagolt hőválasza alapján evidens: a hőstimulus minden másodpercében magasabb volt a tüskékisülések száma és a maximális kisülési frekvencia is szignifikánsan megnőtt (**11. ábra, felső panel**).

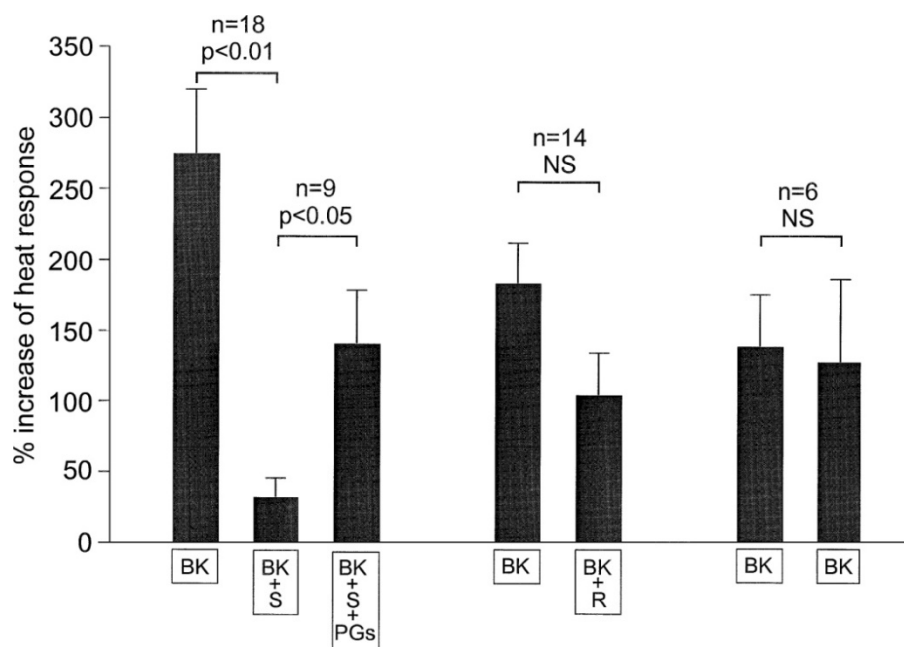
A receptív terület R(-)-flurbiprofennel ($1 \mu\text{M}$, 10 perc) történő szuperfúzióját követően a bradikinin ($10 \mu\text{M}$, 5 perc) még képes volt szignifikáns mértékű hőszenzibilizációt kiváltani: a hővel kiváltott akciós potenciálok számát emelte ($20,6 \pm 4,3$ -ről $38,7 \pm 7,6$ -re, $p < 0,01$, Wilcoxon-teszt és Student-féle egymintás t-próba), a hőküszöböt csökkentette ($40,2 \pm 0,6$ -ről $37,2 \pm 1,0$ °C-ra, $p < 0,01$, Wilcoxon-teszt és Student-féle egymintás t-próba) (**10. ábra**). Ugyanakkor a rostok átlagolt hőválasza alapján a szenzibilizáció mértéke kisebbnek tűnt (**11. ábra, alsó panel**). A hőválasz növekedésének százalékos értéke alapján az R(-)-flurbiprofen okozta gátlás (183 ± 29 -ről $104 \pm 30\%$ -ra, ami $33 \pm 21\%$ -os csökkenésnek felel meg) nem érte el a statisztikai szignifikancia szintjét ($p = 0,15$ a Wilcoxon-teszttel, $p = 0,11$ a Student-féle egymintás t-próbával) (**12. ábra, középső panel**). Ugyanez igaz a hőküszöbcsökkenés gátlására is: $4,3 \pm 1,0$ versus $3,0 \pm 0,7$ °C (statisztikai adatokat nem közlünk). Hasonlóan az S(+)-flurbiprofenhez, az R(-)-flurbiprofen sem gátolta a nem szenzibilizált hőválaszt (**10. ábra**).



10. ábra. Az R(+)-flurbiprofen [R(+)-flu, $1 \mu\text{M}$] hatása a bradikinnel (BK, $10 \mu\text{M}$) kiváltott hőszenzibilizációra. A nyilak hőingerlést jelentenek, az oszlopok átlag \pm SEM. A fekete oszlopok a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok számát jelentik (bal oldali függőleges tengely), az üres oszlopok a hőküszöböt mutatják (jobb oldali függőleges tengely); a kapcsos zárójelek a statisztikai összehasonlításokat (Wilcoxon-teszt és Student-féle egymintás t-próba) mutatják, és egyaránt vonatkoznak mindkét (fekete és üres) oszloppárra. NS: statisztikailag nem szignifikáns.



11. ábra. A C-MH rostok átlagolt hőválasza bradikinin (BK, 10 μ M, 5 perc) adása előtt (fekete oszlopok) és után (üres oszlopok) az R(-)-flurbiprofen [S(+)-flu, 1 μ M, 15 perc] hiányában és jelenlétében.



12. ábra. Az S(+)-flurbiprofen (S), az S(+)-flurbiprofen plusz prosztaglandinok (PGs, PGE₂ és PGI₂) és az R(-)-flurbiprofen (R) bradikinnel (BK) kiváltott hőszensibilizációra kifejtett hatásának összehasonlítása. Az utolsó két oszlop kontrollként a flurbiprofen-előkezelés nélkül ismételt bradikininadás szenzibilizáló hatását mutatja. Az oszlopok (átlag \pm SEM) a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok számának százalékos növekedését jelentik. A BK+S és a BK+R közötti különbség statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$, Mann-Whitney U-teszt and Student-féle kétmintás t-próba). A szögletes zárójelek Wilcoxon-teszttel és Student-féle egymintás t-próbával végzett statisztikai összehasonlításokat mutatnak. NS: statisztikailag nem szignifikáns.

3.2.3. Megbeszélés

Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a bradikinin hőszenszibilizáló hatása a patkány n. saphenusban futó C polimodális nociceptorokra jelentős mértékben COX-függő jelenség. Ezt a nézetet támogatja, hogy a hatást a nem-szelektív COX-gátló flurbiprofen aktív enantiomere praktikusán megszüntette, míg a kevésbé aktív izomer csak egy kisebb mértékű, statisztikailag nem szignifikáns gátlást okozott. Az S(+)-flurbiprofen valószínűsíthetően a COX-gátlás révén védte ki a bradikinin szenzibilizáló hatását, hiszen (i) az R(–)-flurbiprofen hatástalan volt; (ii) a szer hatása – legalábbis részben – felfüggeszthető volt kívülről adott prosztaglandinokkal (PGE₂ és PGI₂); (iii) a szert olyan koncentrációban adtuk, amelyben a racém keverék képes teljes mértékben gátolni a nyugalmi és a bradikinnel stimulált PGE₂-szintézist a patkány bőrében (Sauer *et al.*, 1998). A kívülről adott prosztaglandinok részleges hatékonysága az S(+)-flurbiprofen hatásának felfüggesztésében azt is jelzi, hogy a szer COX-gátlóként a prosztaglandinszintézis csökkentése és nem a leukotriénképződés – arachidonsav-túlkínálat miatti – fokozása (Randall *et al.*, 1980) révén hatott. Mindezzel összezseng, hogy a kimutatták, hogy a PGE₂ és a PGI₂ képes szenzibilizálni a nociceptorokat hővel szemben (Mizumura *et al.*, 1987; 1993a; Rueff és Dray, 1993; Evans *et al.*, 1999). A prosztaglandin-szubsztitúció hatékonyságának részleges volta felveti annak lehetőségét, hogy a prosztaglandinokon kívül más COX-termékek (pl. szabad gyökök) is hozzájárulnak a bardykinin hőszenszibilizáló hatásához. Egy másik lehetőség, hogy bradikinin hatására a nociceptorokon belül is képződnek prosztaglandinok, és a kívülről bevitt prosztaglandinok nem képesek teljes mértékben utánozni az intraneuronálisan képződött endogén ágenseknek a hatását. Említésre érdemes, hogy a COX-1-et kimutatták DRG neuronokban (Vasko *et al.*, 1994; Chopra *et al.*, 2000). A COX-termékek forrásai elméletileg lehetnek maguk a nociceptív idegvégződésesek vagy más, nem neuronális (pl. epidermális, endothelialis) sejtek, hiszen a bradikininreceptorokat, – amelyek aktiválhatják a PLA₂-t (Thayer *et al.*, 1988; Burgess *et al.*, 1989) – mindezen sejtípusokban kimutatták (Hall, 1997). Azonban a prosztaglandinok zöme feltehetően nem-neuronális eredetű, mivel a patkánybőr krónikus denervációja nem csökkentette a bardykininnel kiváltott PGE₂-felszabadulást (Sauer *et al.*, 2000).

Az R(–)-flurbiprofen nem-szignifikáns, enyhe gátló hatása a bradikinnel kiváltott hőszenszibilizációra két dologgal magyarázható. Az egyik lehetőség, hogy a használt preparátum – kis affinitása ellenére – gyenge COX-gátló hatással rendelkezett az alkalmazott koncentrációban. Minthogy az R(–)-flurbiprofen racemizációja nem valószínű a bőrben, a preparátum korlátozott tisztasága lehet a háttérben (az általunk használt R(–)-flurbiprofen-preparátum 2% S(+)-flurbiprofent tartalmazott; Peskar *et al.*, 1991). Egy másik lehetőség, hogy

az R(-)-flurbiprofen szenzibilizációt gátló hatása független a COX-gátlástól; ebben az esetben ez a hatáskomponens járulékosan szerepet játszhat az S(+)-flurbiprofen hatásában is.

Az S(+)-flurbiprofen drasztikus gátló hatása a bradikinin okozta hőszenzibilizációra összhangban áll korábbi *in vivo* adatokkal, miszerint a bradikinin intraplantáris injekciójával kiváltott termális hiperalgédia gátolható volt szisztémásan adott indomethacinnal (Schuligoi *et al.*, 1994). A jelen eredmények fényében ez a gátló hatás úgy értelmezhető, hogy a bradikinin hatására a bőrben képződött COX-termékek, valószínűleg prosztaglandinok közvetítik a hiperalgédiát. Jelen eredményeinket megerősítette és kibővítette egy újabb vizsgálat is, amelyik kimutatta, hogy az általunk alkalmazott *in vitro* preparátumban a bradikinin hőszenzibilizáló hatását mind a COX-1, mind a COX-2 szelektív gátlása képes csökkenteni, jelezve mindkét izoenzim közvetítő szerepét (Mayer *et al.*, 2007).

Általánosan elfogadott nézet, hogy a bradikinin hőszenzibilizáló hatását a PKC-aktiváció közvetíti, legalábbis rövid expozíciók esetében (Mizumura *et al.*, 1997; Cesare and McNaughton, 1996; Cesare *et al.*, 1999). A prosztaglandinok jelen vizsgálatban kimutatott domináns szerepe a bradikinin hőszenzibilizáló hatásában nem valószínű, hogy PKC-mediált, mivel a prosztaglandinok döntően a cAMP–PKA jelátviteli úton fejtik ki szenzibilizáló hatásukat (Mizumura *et al.*, 1993a; Mizumura *et al.*, 1993b; Cui és Nicol, 1995; Hingtgen *et al.*, 1995; England *et al.*, 1996; Kress *et al.*, 1996; Lopshire és Nicol, 1998; Evans *et al.*, 1999). Egy lehetséges feloldása ennek az ellentmondásnak az a hipotézis, amely szerint a bradikinin hőszenzibilizáló hatásának kezdeti, rövid szakaszában a PKC szerepe a domináns, de a válasz későbbi periódusában – elsősorban hosszabb bradikinin-expozíció esetén – a COX–prosztaglandin–PKA útvonal veszi át a főszerepet.

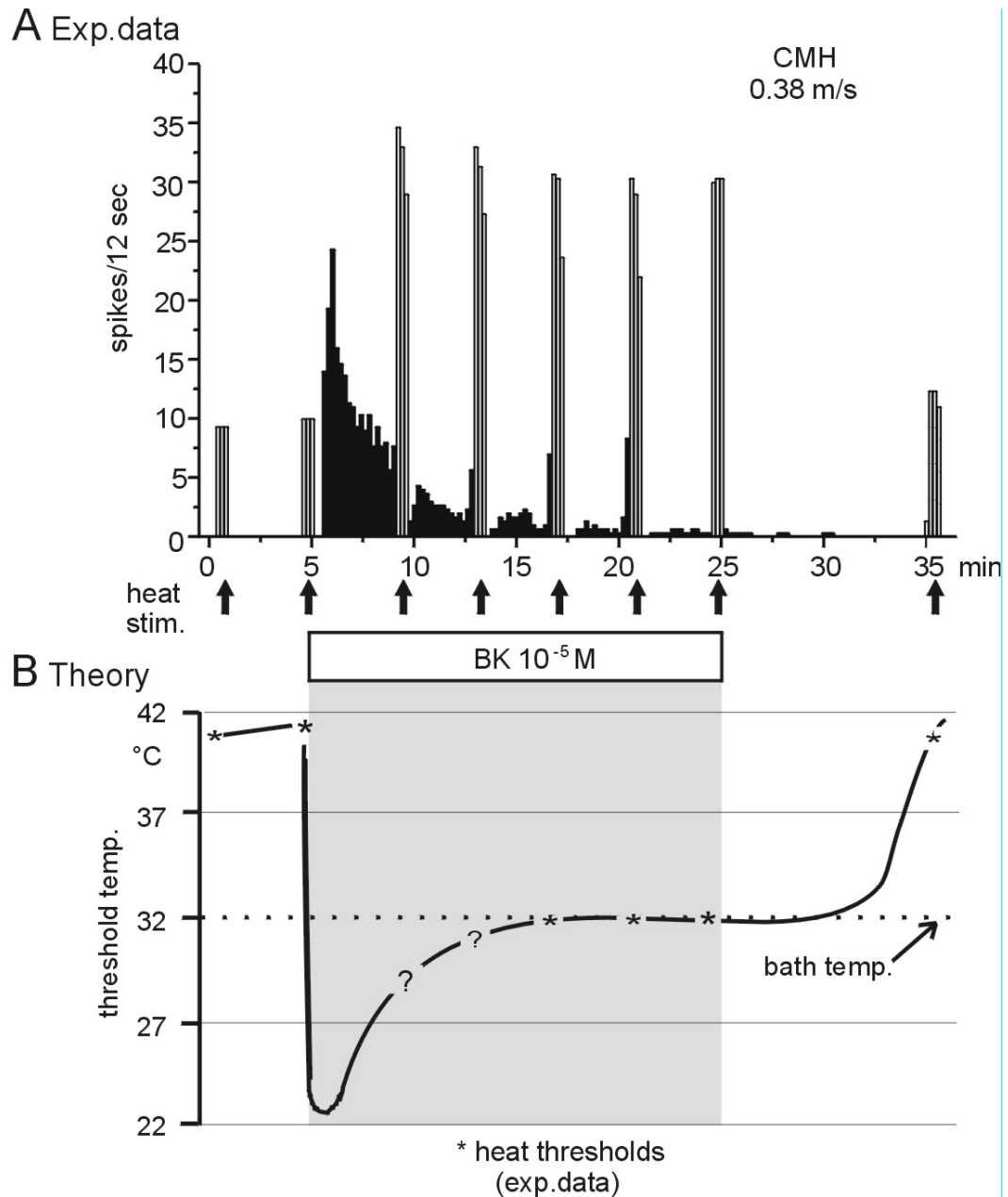
A bradikininrel kiváltott hőszenzibilizáció molekuláris mechanizmusának végső eleme valószínűleg a polimodális nociceptorok membránjában expresszáldó hőérzékeny ioncsatornák (TRPV1 és egyebek, lásd 1.4. pont) facilitációja. Mind a bradikinin (Chuang *et al.*, 2001; Sugiura *et al.*, 2002; Fischer és Reeh, 2007; Kichko és Reeh, 2009), mind a prosztaglandinok képesek a TRPV1 működésének serkentésére (Moriyama *et al.*, 2005; Fischer és Reeh, 2007; Schnitzler *et al.*, 2008). Elméletileg nem kizárható, hogy a feszültségfüggő Na⁺-csatornák, köztük a nociceptorokban expresszáldó Nav1.8 facilitációja felelős a bradikinin, illetve a prosztaglandinok hőszenzibilizáló hatásáért, hiszen az említett ágensek ezen csatornák működését serkenteni tudják (Gold *et al.*, 1998). Ez a lehetőség azonban valószínűtlen, mivel a bradikinin termális szenzibilizáló hatásához a vizsgált modellben nem kapcsolódik mechanikai ingerrel szembeni szenzibilizáció (Lang *et al.*, 1990; Koltzenburg *et al.*, 1992a), márpedig a

receptorpotenciál akciós potenciállá való konverziójának facilitációja minden ingermodalitással szemben fokozott érzékenységet kell, hogy okozzon.

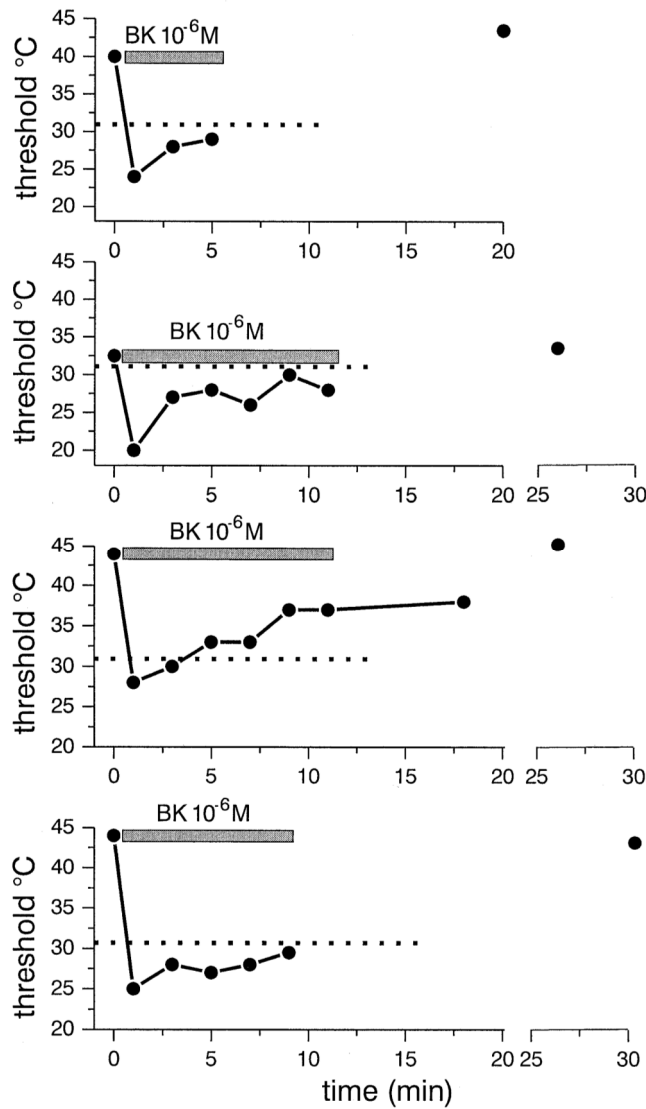
3.3. A nociceptorok termális szenzibilizációja és aktivációja közötti kapcsolat a bradikinin példáján: egy vonzó hipotézis

Ez a hipotézis az alábbi ellentmondás feloldására született (a referenciákat illetően lásd Reeh és Pethő, 2000). Az *in vitro* lábháti bőr–n. saphenus preparátumon patkányban a bradikinin izgató (akciós potenciált kiváltó) és hőszenszibilizáló hatását döntően a B₂ bradikininreceptor közvetíti, amely hajlamos a deszenzibilizációra. Ennek megfelelően ismételt alkalmazás esetén a bradikinin izgató hatása jelentős tachyphylaxiát mutat, de a peptid termális szenzibilizáló hatása csökkenés nélkül ismételhető, azaz nem mutat tachyphylaxiát (lásd 3.2. pont). Ismert volt az is, hogy a kapszaicin, bradikinin a DRG neuronok, illetve TRPV1-gyel transzfektált sejtek termális aktivációs küszöbét 25–30 °C alá tudja csökkenteni (Cesare és McNaughton, 1996; Tominaga *et al.*, 1998; Vyklicky *et al.*, 1999); illetve a receptív terület hűtésével a kapszaicin vagy a mustárolaj fájdalomkeltő, illetve akcióspotenciál-generáló hatása gátolható (Szolcsányi, 1977; Reeh *et al.*, 1986; Kilo *et al.*, 1995). A fentiek alapján hipotézisünk az volt, hogy a bradikinin nem rendelkezik nociceptor-aktiváló hatással, primer hatása a hővel szembeni szenzibilizáció, amely során a nociceptorok aktivációs hőküszöbe az aktuális környezeti hőmérséklet alá csökken (**13. ábra**). Ennek hatására a normál környezeti hőmérséklet hőingerként hat, és így akciós potenciálok kisülését váltja ki, létrehozva a bradikinin (látszólagos) izgató hatásaként értelmezett választ. Feltételezésünk szerint a hőküszöbcsökkenés részleges deszenzibilizációt mutat: a hőküszöb a bradikinin jelenlétében a legalacsonyabb kezdeti értékről gyorsan emelkedik, majd stabilizálódik egy, a környezeti hőmérséklethez közeli szinten. Előbbi magyarázza a nociceptor-kisülés csökkenését, míg utóbbi lehetővé teszi, hogy a nociceptor hőre adott válasza szenzibilizált formában többé-kevésbé állandó nagyságú maradjon. Tehát a hőszenszibilizáló hatás is mutatja a tachyphylaxia jelenségét a korai fázisban, de ennek kimutatását megakadályozza a kezdeti folyamatos nociceptor-kisülés.

A hipotézist alátámasztó adatokat sikerült nyerni aktívan, 15–20 °C-ra lehűtött lábháti bőr–n. saphenus preparátumon, amelyben a bradikinin 10⁻⁵ M koncentrációban – amely magas frekvenciájú kisüléseket okozott 32 °C-on – egyetlen akciós potenciált sem váltott ki. Ezen túlmenően a hűtött preparátumon sikerült igazolni, hogy a bradikinin hatására a hőküszöb jóval a normál bőrhőmérséklet (32 °C) alá, akár 20 °C-ig csökkenhet, majd egyértelmű visszatérést mutat úgy, hogy 5–10 percig a hőküszöb 32 °C alatt marad (**14. ábra**).



13. ábra. A bradikinin (BK) pronociceptív hatásának új teóriája. **A panel:** Az in vitro izolált patkánybőr–n. saphenus preparátumban vizsgált C polimodális (C-MH) nociceptor válasza (akciós potenciálok száma 12 másodperces intervallumokban) bradikininre (fekete oszlopok) és ismételt hőingerlésekre (fehér oszlopok, a hőingerlések nyilakkal jelölve). A bradikinin akcióspotenciált kiváltó hatása jelentős deszenzibilizációt mutat, ellenben a hőszensibilizáló hatás nagysága az ismételt hőstimulusok során alig csökken. **B panel:** Az A panelben mutatott jelenségek lehetséges magyarázata. A csillagok az A panelből származó valós hőküszöbértékek, a kérdőjellel jelöltek hipotetikus értékek, amelyeket nem lehetett megmérni a bradikinin okozta intenzív nociceptorkisülés miatt. Az összekötő vonal szintén hipotetikus, és a bradikininrel kiváltott tüskesisülés hisztogramjának tükörképéként lett megrajzolva.



14. ábra. A bradikinin (BK) hatása 4 különböző C polimodális nociceptor aktivációs hőküszöbére a 18–20 °C-ra lehűtött patkánybőr–n. saphenus preparátumban in vitro. A pontozott vonal a bőrpreparátum normális hőmérsékletét (32 °C) jelzi. A sugárzó hővel végzett ingerlések „ramp”-formájúak (19–45 °C 40 s alatt) voltak, és a küszöb elérése után meg lettek szakítva annak érdekében, hogy a hőstimulációk gyakran ismételve legyenek.

Hipotézisünk megfogalmazása óta további mediátorokról mutatták ki, hogy a nociceptív hőküszöböt a mag- vagy akár a bőrhőmérséklet alá tudják levinni: ATP, szerotonin, PGE₂/PGI₂ (Tominaga *et al.*, 2001; Sugiura *et al.*, 2004; Moriyama *et al.*, 2005). Hipotézisünk segítségével számos jelenség jól magyarázható. A bradikinin hőszensibilizáló hatása kifejezettebb azon polimodális nociceptorok esetében, amelyeket a peptid aktiválni is tud. Az is ismert, hogy a bradikinin a belső szervekben (ahol magasabb a hőmérséklet) a nociceptív rostok nagyobb hányadát aktiválja, mint a 32 °C-os bőrben. Közismert, hogy a lokális hűtés akut gyulladásos (pl. appendicitis vagy pulpitis esetében) vagy traumás fájdalom esetén analgetikus hatású. A kapszaicintartalmú csípős paprikával készült étel okozta égő fájdalom a szájnyálkahártya hűtésével (hideg folyadék ivása révén) azonnal és teljesen kikapcsolható. A teória arra a

teleologikus kérdésfelvetésre is magyarázatot kínál, hogy miért innerválják belső szerveinket (belek, ureter, dura mater) olyan polimodális nociceptorok, amelyek hőküszöbe 43 °C, ami az étellel összeegyeztethetetlen. E nociceptorok valószínű funkciója a gyulladásos mediátorok hatására történő szenzibilizálódás lehet, amelynek részeként aktivációs küszöbük a maghőmérséklet (37 °C) alá csökken, lehetővé téve, hogy az aktuális belső hőmérséklet folyamatos hőingerként hatva tartós nociceptor-kisülést tartson fenn. Mindez „felértékeli” a termális allodyniát ahhoz a hétköznapi szinthez képest, hogy jelentősége abban áll, hogy meleg vízzel való kontaktus vagy meleg folyadék fogyasztása forrázásos sérüléshez vezethet. Feltételezhető, hogy gyulladásos állapotokban jelentkező „spontán” fájdalom – legalábbis részben – a termonociceptorok masszív hőküszöbcsökkenése következményeként jön létre.

3.4. A PGE₂ és PGI₂ hatása a forró ingerrel kiváltott nociceptor-kisülésre és CGRP-felszabadulásra izolált patkánybőrben

3.4.1. Előzmények és célkitűzés

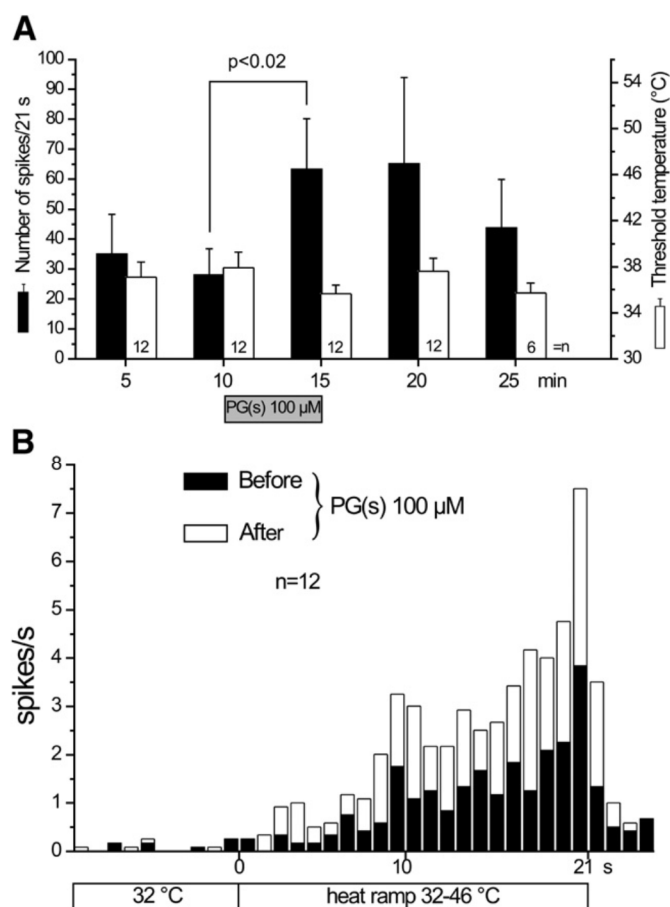
Korábbi kísérletsorozatunkban a polimodális nociceptorok bradikininnel kiváltott hőszenszibilizációjában COX-termékek, főként prosztaglandinok (PGE₂ és/vagy PGI₂) jelentős közvetítő szerepét tártuk fel az izolált patkánybőrben (lásd 3.2. pont). Amint arról a bevezetésben (1.5. pont) említés történt, a peptiderg nociceptorok nemcsak afferens, azaz akcióspotenciál-generáló funkcióval bírnak, hanem a neuropeptidek felszabadulása révén lokális-efferens működéssel is rendelkeznek. Kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a kívülről adott prosztaglandinok (PGE₂ és PGI₂) tudják-e szenzibilizálni a perifériás nociceptorok forró ingerrel kiváltott afferens és efferens funkcióját az izolált patkánybőrben. A két funkciót polimodális nociceptorokról történő akcióspotenciál-elvezetéssel, illetve az immunreaktív CGRP (iCGRP) felszabadulásának mérésével vizsgáltuk.

3.4.2. Eredmények

Elektrofiziológiai kísérletek: a PGE₂ és PGI₂ hatása a C polimodális nociceptorok hőválaszára

Összesen 18 C polimodális (C-MH) nociceptorról történt elvezetés, amelyek hő- és mechanikai ingerre reagáltak, de hidegingerlésre nem. A rostok egyike sem reagált akcióspotenciál-kisüléssel a receptív területre alkalmazott prosztaglandin(ok)ra. A 10 µM PGE₂ vagy 10 µM PGI₂ nem fokozta a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok számát, illetve nem befolyásolta a rostok hőküszübét (n=6, adatokat nem mutatunk). A 100 µM PGE₂ hatására nem-szignifikáns módon megnőtt a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok száma (22±8 *versus*

38,5±10,6 tüskeisülés, $p=0,06$, $n=4$, Wilcoxon-teszt), a két prosztaglandin kombinációja (100 μM PGE_2 plusz 100 μM PGI_2) már szignifikáns növekedést eredményezett (31±12,5 *versus* 76±24 tüskeisülés, $p<0,02$, $n=8$, Wilcoxon-teszt). A két adatcsoport összevonása ($n=12$) szintén szignifikáns növekedést eredményezett (**15. ábra, A panel**). A nociceptorok hőküszöbe nem mutatott szignifikáns eltérést (az összevont adatok alapján 37,1±1,3 °C *versus* 35,7±0,8 °C, $n=12$, Wilcoxon-teszt, **15. ábra, A panel**). A hőválasz nagyságának növekedése és a hőküszöb változásának hiánya jól látszik a rostok átlagolt hőválasza alapján is (**15. ábra, B panel**).

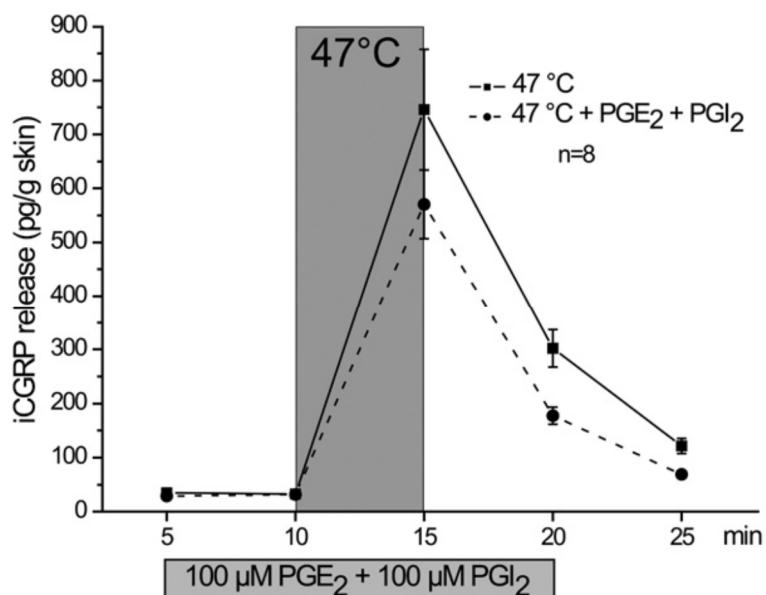


15. ábra. A prosztaglandin(ok) (PGs) hatása a C polimodális (C-MH) nociceptorok hőingerlésre adott válaszára az izolált patkánybőrben. A PGE_2 -t önmagában ($n=4$) vagy PGI_2 -vel kombinációban ($n=8$, mindkettő 100 μM) 5 percen át alkalmaztuk; az ábra az összevont adatokat mutatja ($n=12$). **A panel:** a fekete oszlopok (bal oldali ordináta) a hőingerlés révén kiváltott akciós potenciálok számát mutatja; az üres oszlopok (jobb oldali ordináta) a hőküszöböt jelzi. Az oszlopok átlag±SEM. A statisztikai analízist Wilcoxon-teszttel végeztük. **B panel:** A 12 polimodális rost átlagolt hőválaszát mutató hisztogram a prosztaglandin(ok) adása előtt és után.

Neurokémiai kísérletek: a PGE_2 és PGI_2 hatása a hővel, illetve alacsony pH-val kiváltott iCGRP-felszabadulásra

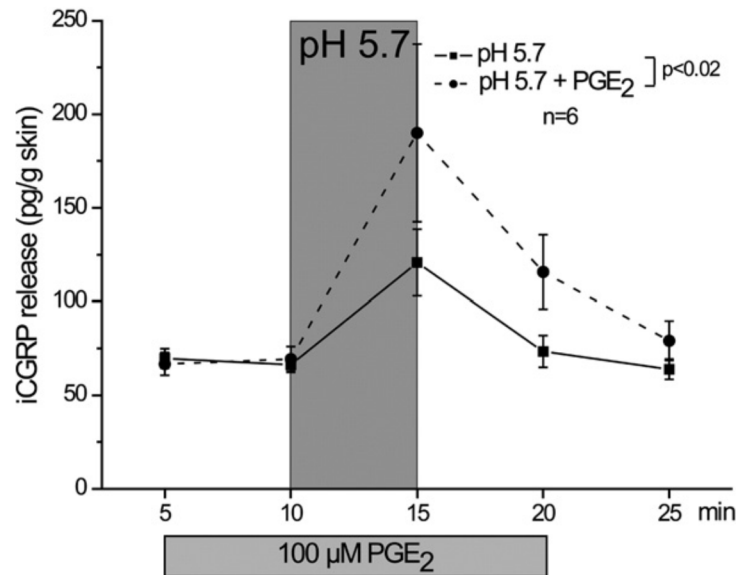
A 47 °C-on történő hőstimuláció 7,6±0,9-szeresére növelte az iCGRP felszabadulását a 32 °C-on mért második bazális értékhez képest (S_3/S_2 , $n=60$, $p<0,05$, Wilcoxon-teszt). Sem a 10

μM PGE_2 ($512 \pm 104 \rightarrow 547 \pm 129$ pg/g „kvázi-AUC”, $n=6$), sem a $10 \mu\text{M}$ PGI_2 ($585 \pm 131 \rightarrow 690 \pm 163$ pg/g „kvázi-AUC”, $n=6$) nem befolyásolta a hőingerlés peptidfelszabadító hatását. A következő sorozatban a $10 \mu\text{M}$ PGE_2 hatását a COX-gátló flurbiprofen jelenlétében vizsgáltuk, annak kizárására, hogy a szenzibilizáló hatás azért nem jön létre, mert az endogén prosztaglandinok telítik receptoraikat, akadályozva a kívülről bevittek kötődését és hatását (okklúzió). A $1 \mu\text{M}$ flurbiprofent már a kimosási periódustól kezdve végig alkalmaztuk a kísérlet során. A $10 \mu\text{M}$ PGE_2 az endogén prosztaglandin-bioszintézis kikapcsolása után sem tudta fokozni a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást ($690 \pm 61 \rightarrow 543 \pm 132$ pg/g „kvázi-AUC”, $n=4$). A tízszer magasabb koncentrációban ($100 \mu\text{M}$) adott PGE_2 sem fokozta a hőinger hatását, inkább egy nem-szignifikáns gátlás volt megfigyelhető ($913 \pm 142 \rightarrow 667 \pm 244$ pg/g „kvázi-AUC”, $n=6$). Hasonló volt a helyzet a $100 \mu\text{M}$ PGE_2 és $100 \mu\text{M}$ PGI_2 kombinációjával is ($983 \pm 138 \rightarrow 683 \pm 73$ pg/g „kvázi-AUC”, $n=18$, **16. ábra**).



16. ábra. A PGE_2 és PGI_2 kombinációjának hatása a 47°C -os hőingerléssel kiváltott iCGRP-felszabadulásra a patkány láb bőrében. Az adatok átlag \pm SEM. A kombináció nem váltott ki szignifikáns hatást a „kvázi-AUC”-értékek (lásd 3.1. pont) statisztikai összehasonlítása (Wilcoxon-teszt) alapján.

Tekintettel arra, hogy a prosztaglandinok nem tudták fokozni a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást, pozitív kontroll keresése céljából megvizsgáltuk, hogy az alacsony pH-val kiváltott választ képesek-e befolyásolni. A 3. inkubációs periódusban alkalmazott 5,7-es pH-jú közeg $1,8 \pm 0,2$ -szeresére ($p < 0,01$, $n=8$, Wilcoxon-teszt) fokozta az iCGRP-felszabadulást a második kontrollperiódushoz képest (**17. ábra**). A $100 \mu\text{M}$ PGE_2 nem befolyásolta a bazális iCGRP-felszabadulást, de szignifikánsan fokozta a protonnal kiváltott választ ($62 \pm 20 \rightarrow 167 \pm 57$ pg/g „kvázi-AUC”, $p < 0,02$, $n=8$, Wilcoxon-teszt; **17. ábra**).



17. ábra. A PGE₂ hatása az alacsony pH-val (protonokkal) kiváltott iGRP-felszabadulásra patkányláb bőrében. Az adatok átlag±SEM. A szer hatása szignifikáns volt a „kvázi-AUC”-értékek (lásd 3.1. pont) statisztikai összehasonlítása (Wilcoxon-teszt) alapján.

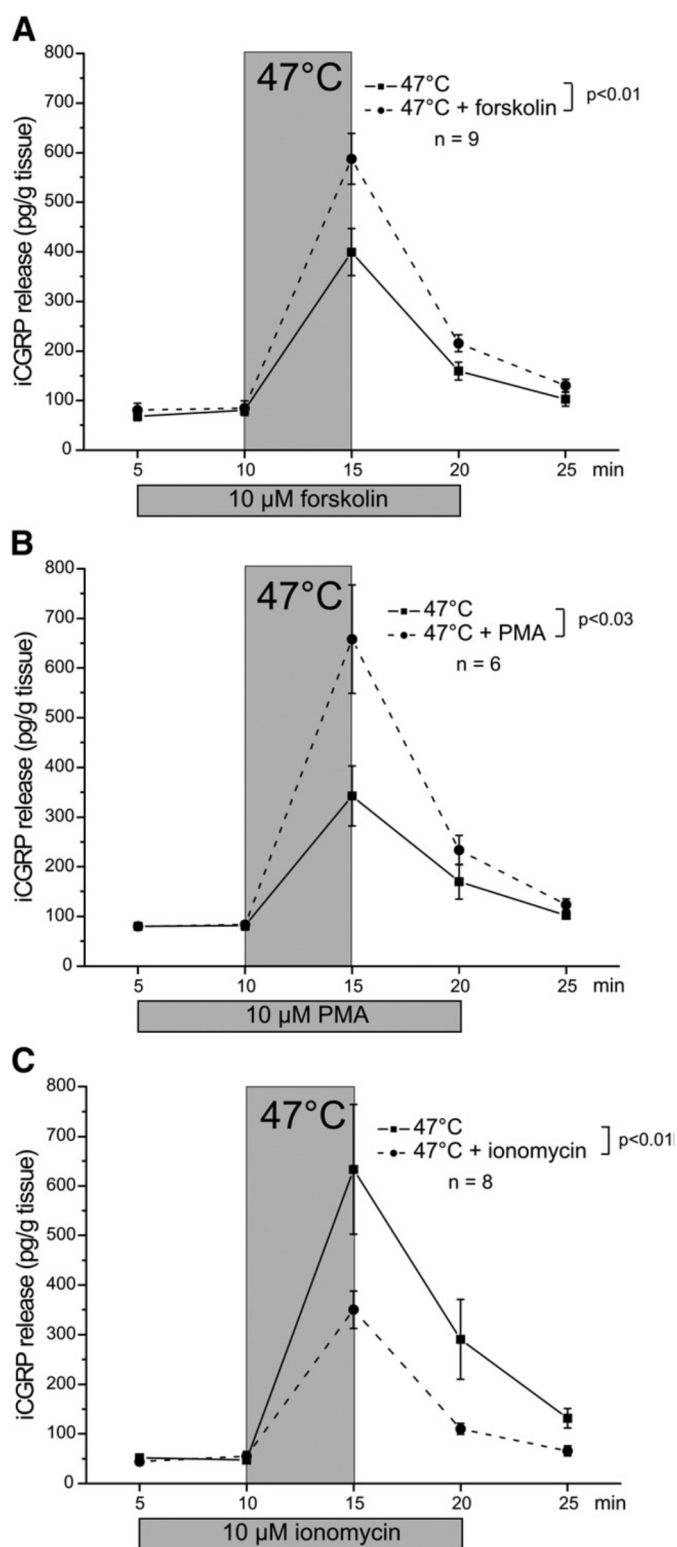
Neurokémiai kísérletek: különböző jelátviteli utak aktivátorainak hatása a hővel kiváltott iGRP-felszabadulásra

Az adenil-ciklázt aktiváló forskolin (10 μM) nem befolyásolta a 32 °C-on mért bazális iGRP-felszabadulást, de szignifikánsan fokozta a 47 °C-on végzett hőingerléssel kiváltott választ (397±67 → 634±72 pg/g „kvázi-AUC”, p<0,01, n=9, Wilcoxon-teszt, **18. ábra, A panel**). Hasonlóan viselkedett a PKC-t aktiváló 10 μM forbolészter PMA (350±98 → 725±136 pg/g „kvázi-AUC”, p<0,03, n=6, Wilcoxon-teszt, **18. ábra, B panel**). A PMA 10-szer alacsonyabb koncentrációja (1 μM), amelyik nem fokozta a hővel kiváltott iGRP-felszabadulást, nem tudta képessé tenni a PGE₂-t (10 μM) a hőválaszt fokozására (927±123 versus 813±97 pg/g „kvázi-AUC”, n=6; ábrán nem szerepel). Mindezzel ellentétben az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációt megnövelő ionomycin (10 μM) nem-szignifikáns mértékben megnövelte a bazális iGRP-felszabadulást, de szignifikáns módon csökkentette a hővel kiváltott választ (829±202 to 350±44 pg/g „kvázi-AUC”, p<0,01, n=8, Wilcoxon-teszt, **18. ábra, C panel**).

3.4.3. Megbeszélés

A PGE₂/PGI₂ elektrofiziológiai vizsgálatokban tapasztalt szenzibilizáló hatása a C polimodális nociceptorok forró ingerrel kiváltott válaszára nem meglepő eredmény, hiszen ugyanebben a modellben ezek az ágensek – legalábbis részben – felfüggesztették a bradikinin hőszenszibilizáló hatásának a COX-inhibitor flurbiprofen általi gátlását (lásd 3.2.2. pont). A két

prostaglandin csak magas koncentrációban volt hatékony, ezzel szemben kutya testisének polimodális nociceptoraiban majdnem 10-szer kisebb koncentráció elég volt a termális szenzibilizációhoz (Mizumura *et al.*, 1987, 1993a).



18. ábra. A forskolin (**A panel**), PMA (**B panel**) és az ionomycin (**C panel**) hatása a 47 °C-os hőingerléssel kiváltott iGRP-felszabadulásra patkányláb bőrén. Az adatok átlag \pm SEM. A forskolin és a PMA facilitáló, valamint az ionomycin gátló hatása szignifikáns volt a „kvázi-AUC”-értékek (lásd 3.1. pont) statisztikai összehasonlítása (Wilcoxon-teszt) alapján.

Kiemelendő, hogy modellünkben csak a küszöbfeletti hőingerrel kiváltott akciós potenciálok száma fokozódott, a hőküszöb változatlan maradt. Ez egyrészt azt példázza, hogy – legalábbis a termális ingerek esetében – a küszöbfeletti ingerre adott válasz nagysága és a hőküszöb szenzibilizálhatóság szempontjából nem feltétlenül kapcsolatosak. Másrészt összhangban van azzal, hogy membránpermeabilis, stabil cAMP-analógok hasonlóképpen viselkedtek ugyanebben a preparátumban (Kress *et al.*, 1996). Emlékeztetünk arra, hogy a proszttaglandinok különböző nociceptor-szenzibilizáló hatásaiban a cAMP–PKA jelátviteli út a domináns (Mizumura *et al.*, 1993b; Cui és Nicol, 1995; Hingtgen *et al.*, 1995; Kress *et al.*, 1996; Lopshire és Nicol, 1998; Smith *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2003). A proszttaglandinok hőszenszibilizáló hatásának egyik lehetséges mechanizmusa, hogy facilitáló hatást fejtenek ki a forró ingerek transzdukciójára a hővel aktiválható ioncsatornák, elsősorban a TRPV1 serkentése révén (Moriyama *et al.*, 2005; Fischer és Reeh, 2007; Schnitzler *et al.*, 2008). A másik lehetőség a transzformáció – a receptorpotenciál tovaterjedő akciós potenciállá való konverziójának – serkentése. Ezzel kapcsolatban ismert, hogy a PGE₂ gátló hatást fejt ki az akciós potenciált követő utó-hiperpolarizáció egy komponensére, és ezáltal növeli a kisülési frekvenciát (Fowler *et al.*, 1985; Gold *et al.*, 1996b). Arra is van bizonyíték, hogy a PGE₂ facilitáló hatású a Na_v1.8 tetrodotoxinrezisztens feszültségfüggő Na⁺-csatornára, amely specifikus a nociceptorokra (Gold *et al.*, 1996a; England *et al.*, 1996; Khasar *et al.*, 1998; Kwong és Lee, 2005). Hozzá kell tenni, hogy egér szenzoros neuronjain a PGE₂ nem fokozta sem a Na_v1.8, sem a Na_v1.9 által közvetített tetrodotoxinrezisztens Na⁺-áramot (Zheng *et al.*, 2007), nyitva hagyva annak lehetőségét, hogy a PGE₂ patkányban esetleg még hatékony lehet ebben a tekintetben.

A neurokémiai kísérletekben meglepve tapasztaltuk, hogy a 100 μM PGE₂ sem egyedül, sem 100 μM PGI₂-vel kombinálva nem fokozta a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást, holott a patkánybőrben növelte a hővel kiváltott nociceptor-kisülések számát. Tekintettel arra, hogy a 47 °C-kal kiváltott iCGRP-felszabadulás csak kb. félmaximális (Kessler *et al.*, 1999), a peptidfelszabadulás szaturálódása nem játszhatott szerepet. Ugyancsak kizárható az endogén prosztanoidok által kiváltott okklúzió lehetősége is, hiszen a COX-gátlóval történt előkezelés mellett is inaktív maradt a kívülről adott proszttaglandin.

Az a tény, hogy mind az adenil-cikláz aktiváló forskolin (ami következményesen aktiválja a PKA-t), mind a PKC-aktivátor PMA fokozta a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást, jelzi, hogy a termális szenzibilizáció mechanizmusai működőképesek voltak a modellben. Ugyanebben a preparátumban a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást kb. felére gátlódott a TRPV1-génhiányos egerekben a vad típushoz képest, jelezve a TRPV1 szerepét a válaszban (Zimmermann *et al.*, 2005). Figyelembe véve, hogy mind a PKA, mind a PKC képes direkt

foszforiláció révén facilitálni a TRPV1 működését (De Petrocellis *et al.*, 2001; Rathee *et al.*, 2002; Premkumar és Ahern, 2000; Numazaki *et al.*, 2002, Moriyama *et al.*, 2005), ez a mechanizmus lehet felelős – legalábbis részben – a forskolin és PMA kísérleteinkben tapasztalt hőszenzibilizáló hatásáért. Az a tény, hogy a PMA 10-szer alacsonyabb koncentrációja, amelyik nem fokozta a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást, nem tette képessé a szintén küszöbalatti PGE₂-t a hőválasz fokozására azt jelzi, hogy modellünkben nem lépett fel additív vagy potencírozó interakció a PMA-val aktivált PKC és a PGE₂-vel aktivált PKA között.

Az intracelluláris Ca²⁺-koncentrációt növelő ionomycin gátló hatása a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulásra több szempontból is meglepő: (i) az exocytosis révén végbemenő neuropeptid-felszabadulás Ca²⁺-függő folyamat (Huang és Neher, 1996; Kessler *et al.*, 1999); (ii) a szer a bazális iCGRP-felszabadulást nem szignifikáns módon, de tendenciájában fokozta; (iii) elektrofiziológiai vizsgálatokban az ionomycin hőszenzibilizációt okozott DRG-neuronokban, illetve perifériás végződéseikben (Kress és Günther, 1999). Amint fent említettük, modellünkben a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulás jelentős mértékben TRPV1-függő (Zimmermann *et al.*, 2005). Az ionomycin hőszenzibilizációt gátló hatásának lehetséges mechanizmusa, hogy az általa kiváltott intracelluláris Ca²⁺-szignál deszenzibilizálta a TRPV1-et a calcineurin közvetítette defoszforiláció révén (Cholewinski *et al.*, 1993; Docherty *et al.*, 1996; Koplas *et al.*, 1997; Mohapatra és Nau, 2005). Az intracelluláris Ca²⁺-koncentráció növekedésekor kezdetben a peptidfelszabadulás átmeneti növekedése várható, ennek csak abortív formáját tapasztaltuk a bazális iCGRP-felszabadulást nem-szignifikáns fokozódásában. A hővel kiváltott válasz átmeneti facilitációját valószínűleg azért nem láttuk, mert nem történt mintavétel a hőingerlés 5 perces periódusának valamely korai időpontjában.

Az a tény, hogy a PGE₂ fokozta az alacsony pH-val kiváltott iCGRP-felszabadulást egyrészt pozitív kontrollként jelzi, hogy a szer „működőképes” volt a rendszerünkben, másrészt összhangban áll azzal, hogy a PGE₂ patkány dura materében a protonnal kiváltott iCGRP-felszabadulást potencírozta (Zimmermann *et al.*, 2002). A protonnal kiváltott ionáram a DRG neuronokban (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000), illetve az alacsony pH-val kiváltott iCGRP-felszabadulás az izolált patkánybőrben (nem közölt megfigyelés) teljesen kiesett TRPV1-génhiányos egerekben, jelezve a TRPV1 domináns szerepét a válaszban. Mivel a PGE₂ fokozta a protonnal kiváltott ionáramot TRPV1-gyel transzfektált sejtekben (Moriyama *et al.*, 2005), a fentiek alapján valószínűsíthető, hogy az alacsony pH a TRPV1 facilitálása révén fokozta a hőválaszt a kísérleteinkben.

Legérdekesebb eredményünk, hogy a prosztaglandin(ok) hőszenzibilizációt okoztak az egyrost-elvezetési kísérletekben, de nem az iCGRP-felszabadulás esetében, magyarázható

lenne azzal, hogy a kétféle választ közvetítő idegvégződés-populáció nem azonos. Figyelembe véve, hogy az IB₄-negatív peptiderg és az IB₄-pozitív nem peptiderg C polimodális nociceptorok egyaránt hőérzékenyek, elképzelhető lenne, hogy a prosztaglandinok csak a nem peptiderg terminálisokra fejtenek ki szenzibilizáló hatást. Azonban ez ellen szól, hogy a PGE₂ fokozta az alacsony pH-val kiváltott iCGRP-felszabadulást. A diszkrepancia valószínűsíthetően inkább arra vezethető vissza, hogy az akciós potenciálok kialakulásának és a neuropeptid-felszabadulásnak a mechanizmusa – beleértve az ioncsatorna-háttérét – eltérő. Előbbi kialakulásához nélkülözhetetlenek a feszültségfüggő Na⁺-csatornák, ellenben az akciós potenciálok (és így a Na⁺-csatornák) szerepe elhanyagolható a peptidfelszabadulásban (Brock *et al.*, 1998; Gover *et al.*, 2003; Németh *et al.*, 2003a). Ugyanakkor a neuropeptid-felszabadulás az extracelluláris térből történő Ca²⁺-beáramlás következménye (Huang és Neher, 1996; Kessler *et al.*, 1999).

3.5. TRPV1-receptor-antagonisták hatása a stimulált CGRP-felszabadulásra izolált patkánybőrben

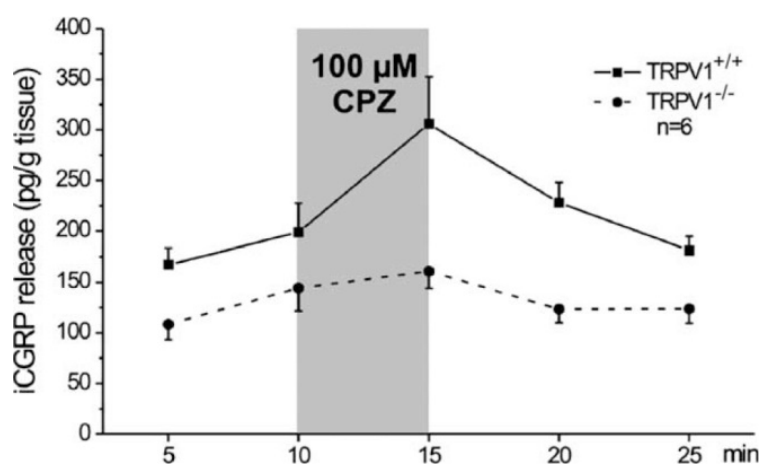
3.5.1. Előzmények és célkitűzés

Mindkét klasszikus TRPV1-antagonistáról, a kapszaicin kompetitív antagonistájának tartott capsazepinről, valamint a TRPV1-receptor ioncsatorna részét blokkoló ruténiumvörösről kimutatták, hogy nemcsak a kapszaicin, hanem a forró ingerek hatását is gátolják TRPV1-gyel transzfektált sejtekben és natív DRG neuronokban (Tominaga *et al.*, 1998; Kirschstein *et al.*, 1999; Nagy és Rang, 1999b; Savidge *et al.*, 2001). Ez azt jelenti, hogy ezekben a modellekben a TRPV1 szerepet játszik a forró ingerek detektálásában, illetve a capsazepin nemcsak a kapszaicin kötődését gátolja kompetitív módon, hanem egyfajta funkcionális gátló hatást fejt ki a TRPV1-en belül a hőingerek transzdukciójára. Ezzel összhangban a forró ingerek (43–55 °C) semmiféle specifikus ionáramot nem váltottak ki TRPV1-génhiányos egérből származó DRG neuronokon (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2005), jelezve a TRPV1 kulcsszerepét a forró ingerek detektálásában a nociceptív elsődleges érző neuronok sejttestén. Ezekben a génhiányos egerekben végzett egyrost-elvezetési kísérletek azt mutatták, hogy a hőérzékeny perifériás nociceptorok aránya kisebb volt, és ezek hőválaszának a nagysága lecsökkent, de a hőküszöb változatlan maradt (Caterina *et al.*, 2000). Ezzel ellentétben TRPV1-génhiányos egéren végzett későbbi vizsgálatokban többségében nem találtak fenotípus-eltérést sem a hőküszöb, sem a hőválasz nagyságának tekintetében (Woodbury *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2005; Banik és Brennan, 2009; Hoffmann *et al.*, 2013). Hasonló eredményt kaptak a ruténiumvörössel kapcsolatban patkánybőr polimodális nociceptoraiban (St. Pierre *et*

al., 2009). A fenti adatok azt sugallják, hogy a TRPV1 szerepe a forró ingerek detektálásában kizárólagosnak tűnik a nociceptív afferensek sejttestén, de csak minimális a perifériás végződésben. Kísérleteink célja az volt, hogy megvizsgáljuk, hogy a bőr perifériás nociceptoraiból történő, hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást hogyan befolyásolja a ruténiumvörös és a capsazepin. Ezáltal kívántuk azt tisztázni, hogy ebben a modellben milyen szerepet játszik a TRPV1 a periférián a forró ingerek transzdukciójában.

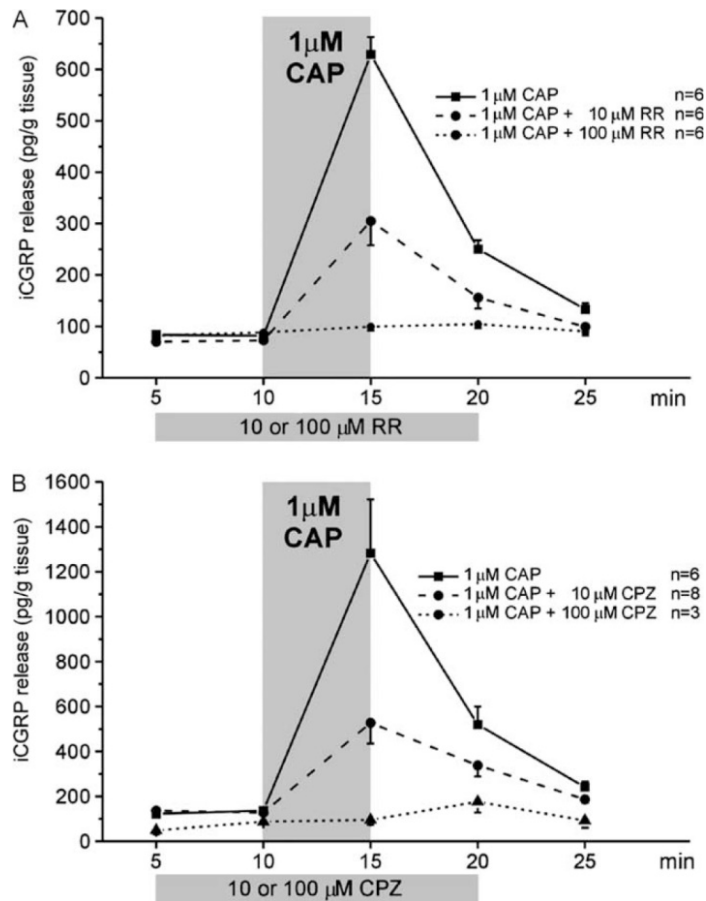
3.5.2. Eredmények

A bazális iCGRP-felszabadulás az 5 perces időszakban 32 °C-on $92,8 \pm 3,8$ pg/g szövet volt ($n=182$), ami 45, illetve 47 °C-os stimuláció hatására $4,1 \pm 0,5$ -, illetve $10,2 \pm 1,6$ -szeresére (S_3/S_2) növekedett ($p < 0,01$ mindkét hőmérsékletnél, Wilcoxon-teszt, **22–24. ábra**). A hőválasz túlnyúlt az ingerlési perióduson, kiterjedve az S_4 periódusra. Sem a ruténiumvörös (10 és 100 μ M), sem 10 μ M capsazepin nem befolyásolta a 32 °C-on mért iCGRP-felszabadulást (**20., 21.A és B, 22., 23.A és 24.A ábra**; számszerű adatokat nem közlünk).



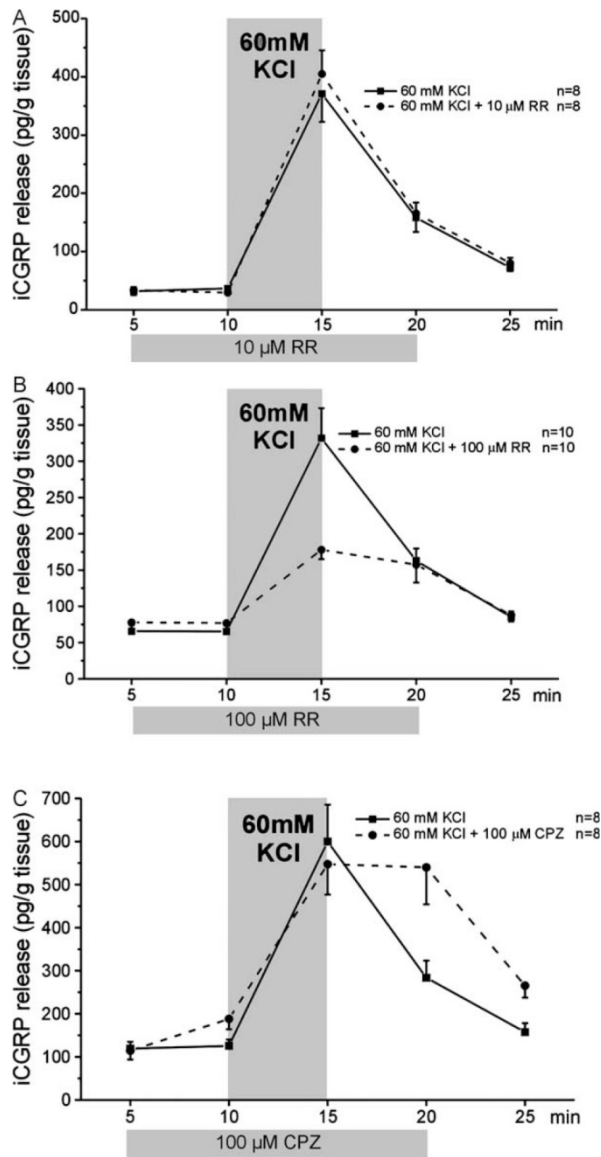
19. ábra. A capsazepin (CPZ) hatása a bazális iCGRP-felszabadulásra vad típusú (TRPV1^{+/+}), illetve TRPV1-génhiányos (TRPV1^{-/-}) egerek bőrén. Az adatok átlag \pm SEM. A capsazepin hatása szignifikáns volt a vad típusban ($p < 0,05$), de nem a génhiányosban az S_3/S_2 értékek (lásd szöveg) Wilcoxon-tesztel történő összehasonlítása alapján.

Ezzel szemben a 100 μ M capsazepin $2,1 \pm 0,2$ -szeresére (S_2/S_1) növelte a 32 °C-on mért iCGRP-felszabadulást ($p < 0,01$, $n=19$, Wilcoxon-teszt, **20.B, 21.C, 23.B és 24.B ábra**). Vad típusú (TRPV1^{+/+}) egerekből származó bőrpreparátumokon a 100 μ M capsazepin $1,6 \pm 0,2$ -szeresére (S_3/S_2) növelte a 32 °C-on mért iCGRP-felszabadulást ($p < 0,05$, $n=6$, Wilcoxon-teszt), ellenben a TRPV1-génhiányos (TRPV1^{-/-}) állatoknál hatástalan volt (**19. ábra**). Mindez arra utal, hogy a capsazepin magasabb koncentrációjának hatása TRPV1-függő, vagyis a szer vélhetően parciális agonistaként viselkedik a TRPV1-receptoron.



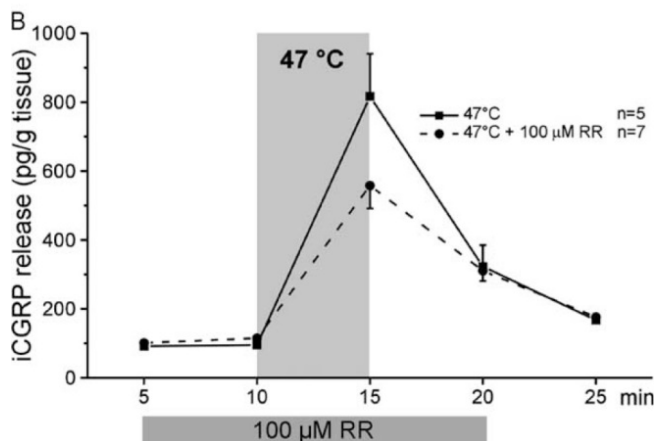
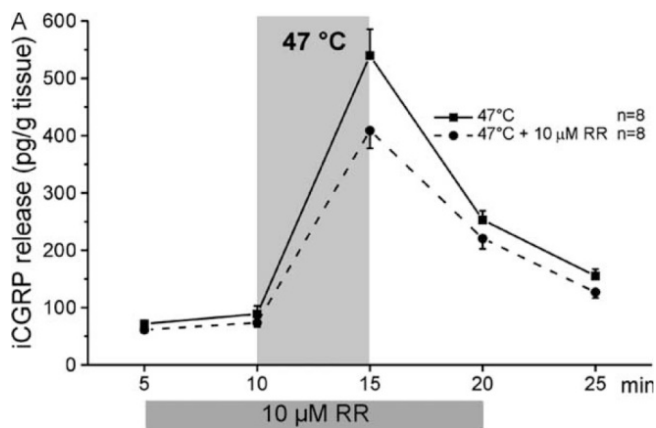
20. ábra. 10 és 100 μM ruténiumvörös (RR, **A panel**) valamint 10 és 100 μM capsazepin (CPZ, **B panel**) hatása az 1 μM kapszaicinnel (CAP) kiváltott iGRP-felszabadulásra a patkányláb bőrén. Az adatok átlag \pm SEM. Mind a ruténiumvörös, mind a capsazepin gátló hatása szignifikáns ($p < 0,01$) volt mindkét koncentrációban a „kvázi-AUC”-értékek (lásd 3.1. pont) statisztikai összehasonlítása (Mann–Whitney U-teszt) alapján.

Mind a 10 μM ruténiumvörös ($716 \pm 36 \rightarrow 315 \pm 63$ pg/g „kvázi-AUC”; $p < 0,01$; Mann–Whitney U-teszt, a gátlás mértéke 56%), mind a 10 μM capsazepin ($1529 \pm 321 \rightarrow 610 \pm 126$ pg/g „kvázi-AUC”; $p < 0,01$; Mann–Whitney U-teszt, a gátlás mértéke 60%) gátolta az 1 μM kapszaicinnel kiváltott iGRP-felszabadulást (**20. ábra**). A magasabb koncentrációban (100 μM) mindkét antagonistát megszüntette a kapszaicin hatását, mutatva, hogy mindkét ágens képes erőteljesen blokkolni a TRPV1-receptort az alkalmazott modellben. A 10 μM ruténiumvörös ($456 \pm 67 \rightarrow 512 \pm 58$ pg/g „kvázi-AUC”; $p = 0,46$; Mann–Whitney U-teszt, **21. ábra, A panel**) – hasonlóan a 100 μM capsazepinhez ($633 \pm 127 \rightarrow 711 \pm 154$ pg/g „kvázi-AUC”; $p = 0,25$; Mann–Whitney U-teszt, **21. ábra, C panel**) – nem befolyásolta szignifikánsan a magas koncentrációjú K^+ -ion okozta membrándepolarizációval kiváltott iGRP-felszabadulást. Ezzel szemben a 100 μM ruténiumvörös jelentősen gátolta azt ($364 \pm 51 \rightarrow 182 \pm 22$ pg/g „kvázi-AUC”; $p < 0,01$; Mann–Whitney U-teszt) (**21. ábra, B panel**).

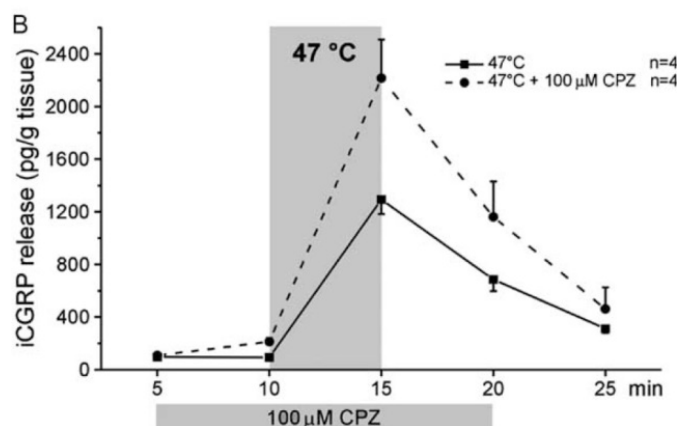
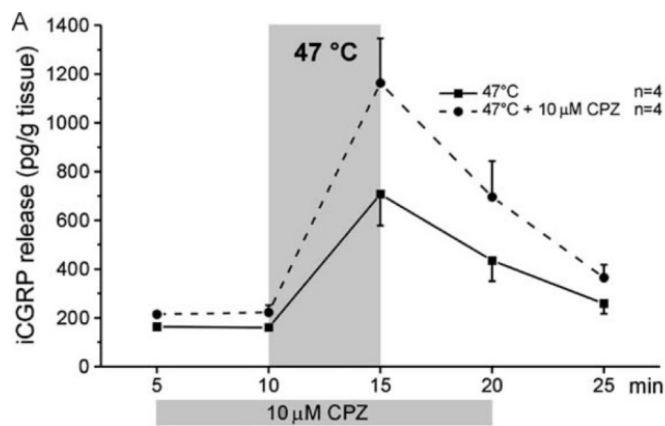


21. ábra. 10 (A panel) és 100 μM ruténiumvörös (RR, B panel) valamint 100 μM capsazepin (CPZ, C panel) hatása a magas koncentrációjú KCl-dal kiváltott iCGRP-felszabadulásra a patkány láb bőrében. Az adatok átlag±SEM. A 100 μM ruténiumvörös gátló hatása szignifikáns ($p<0,01$), a 10 μM ruténiumvörös és a 100 μM capsazepin hatása nem volt szignifikáns a „kvázi-AUC”-értékek (lásd 3.1. pont) statisztikai összehasonlítása (Mann–Whitney U-teszt) alapján.

A ruténiumvörös sem a 10 ($615\pm72 \rightarrow 483\pm35$ pg/g „kvázi-AUC”; $p=0,17$; Mann–Whitney U-teszt, **22. ábra, A panel**), sem a 100 μM-os koncentrációban ($949\pm197 \rightarrow 638\pm98$ pg/g „kvázi-AUC”; $p=0,29$; Mann–Whitney U-teszt, **22. ábra, B panel**) nem tudta szignifikánsan csökkenteni a 47 °C-os hőstimulációval kiváltott iCGRP-felszabadulást (**22. ábra**). A capsazepin hasonlóan viselkedett: sem a 10 ($821\pm201 \rightarrow 1414\pm341$ pg/g „kvázi-AUC”; $p=0,25$; Mann–Whitney U-teszt, **23. ábra, A panel**), sem a 100 μM-os koncentrációja nem volt gátló hatású ($1793\pm178 \rightarrow 2953\pm492$ pg/g „kvázi-AUC”; $p=0,08$; Mann–Whitney U-teszt, **23. ábra, B panel**), ellenkezőleg, egy nem-szignifikáns fokozódás volt megfigyelhető. A capsazepint megvizsgáltuk egy kisebb intenzitású (45 °C) hőstimuláció kapcsán is: a 10 μM továbbra is szignifikáns hatás nélküli volt ($281\pm59 \rightarrow 556\pm134$ pg/g „kvázi-AUC”; $p=0,08$; Mann–Whitney U-teszt, **24. ábra, A panel**), de 100 μM esetén az iCGRP-felszabadulás fokozódása már szignifikánsnak bizonyult ($539\pm68 \rightarrow 1576\pm319$ pg/g „kvázi-AUC”; $p<0,05$;

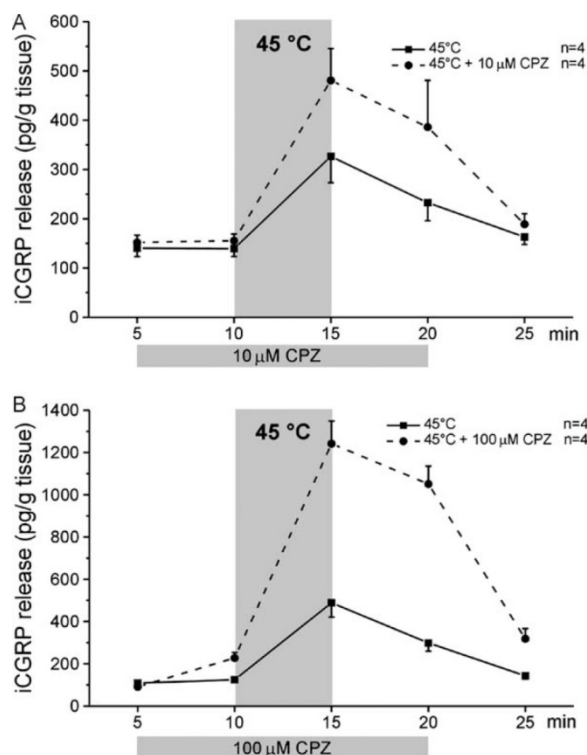


22. ábra. 10 (A panel) és 100 μM ruténiumvörös (RR, B panel) hatása a 47 °C-os hőingerléssel kiváltott iCGRP-felszabadulásra a patkány láb bőrében. Az adatok átlag±SEM. A ruténiumvörös egyik koncentrációja sem váltott ki szignifikáns hatást a „kvázi-AUC”-értékek (lásd 3.1. pont) statisztikai összehasonlítása (Mann–Whitney U-teszt) alapján.



23. ábra. 10 (A panel) és 100 μM capsazepin (CPZ, B panel) hatása a 47 °C-os hőingerléssel kiváltott iCGRP-felszabadulásra a patkány láb bőrében. Az adatok átlag±SEM. A capsazepin egyik koncentrációja sem váltott ki szignifikáns hatást a „kvázi-AUC”-értékek (lásd 3.1. pont) statisztikai összehasonlítása (Mann–Whitney U-teszt) alapján.

Mann–Whitney U-teszt, **24. ábra, B panel**). Ez a fokozódás láthatóan nagyobb volt, mint a capsazepin saját hatásának (lásd fent) és a hőstimuláció hatásának az összege, mutatva, hogy a capsazepin facilitáló hatást fejtett ki a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulásra.



24. ábra. 10 (A panel) és 100 μM capsazepin (CPZ, B panel) hatása a 45 °C-os hőingerléssel kiváltott iCGRP-felszabadulásra a patkányláb bőrén. Az adatok átlag±SEM. A 10 μM capsazepin hatása nem volt szignifikáns, de a 100 μM-é igen ($p < 0,05$) a „kvázi-AUC”-értékek (lásd 3.1. pont) statisztikai összehasonlítása (Mann–Whitney U-teszt) alapján.

3.5.3. Megbeszélés

Korábbi eredményeket (Kessler *et al.*, 1999) megerősítve a 47, illetve 45 °C-on történő hőstimuláció jelentős, illetve közepes mértékű iCGRP-felszabadulást váltott ki. Az előbbi válasz alkalmasnak tűnt a TRPV1-antagonisták esetleges gátló hatásának kimutatására. Azonban a ruténiumvörös sem a kisebb (10 μM), sem a magasabb (100 μM) koncentrációban nem csökkentette a 47 °C-on történő hőstimuláció hatását, mindössze egy nem-szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető, amely a két koncentrációnál közel azonos volt. Ez a két koncentráció gátolta, illetve teljesen felfüggesztette a kapszaicin iCGRP-felszabadító hatását, jelezve, hogy a ruténiumvörös képes erőteljesen blokkolni a TRPV1-receptort a vizsgált modellben. A 10 μM ruténiumvörös hatása modellünkben szelektívnek mondható a TRPV1-receptorra, hiszen a magas koncentrációjú K^+ -ionnal kiváltott peptidfelszabadulást nem befolyásolta. Ez utóbbi ágens a membrán depolarizációja és a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák

megnyílása révén okoz iCGRP-felszabadulást, emiatt alkalmas szelektivitási kontrollnak. A ruténiumvörös magasabb koncentrációja (100 μM) már nem tekinthető szelektívnek, mivel a K^+ -ion hatását is gátolta. Ezzel összhangban kimutatták, hogy 10 μM fölötti koncentrációban a szer gátolja a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákat is (lásd Amann és Maggi, 1991). Mindezek fényében meglepő, hogy a 100 μM -os koncentráció nem csökkentette szignifikánsan a hőingerlés hatását. Ennek oka nem ismert, de az a lehetőség kizárható, hogy a ruténiumvörös esetleg járulékos peptidfelszabadító hatással bír, mivel a szer nem befolyásolta a 32 °C-on mért bazális felszabadulást.

Hasonlóan a ruténiumvöröshöz, a capsazepin két koncentrációja (10 és 100 μM) gátolta, illetve teljesen felfüggesztette a kapszaicin iCGRP-felszabadító hatását, jelezve, hogy a capsazepin is erőteljesen blokkolja a TRPV1-receptort. A capsazepin – a ruténiumvörössel ellentétben – fokozta a hőingerléssel kiváltott iCGRP-felszabadulást, azonban ez a tendencia csak az alacsonyabb, 45 °C-os stimuláció és a magasabb capsazepinkoncentráció mellett vált szignifikánssá. Ez utóbbi hatás és a 100 μM capsazepin 32 °C-on mért bazális iCGRP-felszabadulást növelő hatása – amely kiesett a TRPV1-génhiányos egerek bőrmintái esetében – amellettszól, hogy a capsazepin parciális agonistaként viselkedett modellünkben a TRPV1-receptoron. A ruténiumvörössel ellentétben a magasabb capsazepinkoncentráció is szelektív maradt a TRPV1-re, mivel nem gátolta K^+ -ion hatását. Emiatt kizárható, hogy valamilyen nem-specifikus (pl. a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák gátlása révén; Docherty *et al.*, 1997) módon gátolná az exocytoticus peptidfelszabadulást. Emiatt valószínűsíthető, hogy a 100 μM hatása 47 °C-on azért nem volt szignifikáns, mert okklúzió lépett fel, nem hagyva teret a további válaszfokozódásnak. Érdekes, hogy patkány soleus izomban a 30–100 μM capsazepin gátolta a K^+ -ionnal kiváltott iCGRP-felszabadulást (Santicioli *et al.*, 1993), jelezve, hogy a szer szelektivitása magasabb koncentrációknál szövetfüggő.

A ruténiumvörössel és capsazepinnel nyert adataink egybevágnak egyrészt azzal, hogy izolált patkány n. ischiadicus preparátumon ezek a TRPV1-antagonisták szintén hatástalanok voltak a forró ingerrel kiváltott iCGRP-felszabadulással szemben (Sauer *et al.*, 1999; 2001), másrészt azzal a nézettel, hogy a forró ingerek perifériás transzdukciójában a TRPV1 szerepe minimális, legalábbis a patkány és egér lábán (lásd 1.4.1.4. pont). A capsazepin nem gátolta a perifériás nociceptorok termális izgatásával kiváltott választ (Dickenson és Dray, 1991; Seno és Dray, 1993). A ruténiumvörös szintén nem gátolta a polimodális nociceptorok hőválaszát az újszülött patkány gerincvelő–farok preparátumban *in vitro* és az izolált lábháti patkánybőrben, noha a kapszaicin hatását blokkolta (Dray *et al.*, 1990; St. Pierre *et al.*, 2009). Magatartási vizsgálatokban a TRPV1-génhiányos egerek hőválasza intakt maradt egészen 50–52 °C-ig

(Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2011; Marics *et al.*, 2014). Mindez azonban nem zárja ki a TRPV1 esetleges járulékos szerepét a neuropeptid-felszabaduláshoz szükséges Ca^{2+} -beáramlás létrehozásában: a ruténiumvörös kísérleteinkben megfigyelt tendenciózus, ámbar nem-szignifikáns gátló hatása ezt tükrözheti. Utóbb végzett kísérletek valóban felvetették a TRPV1 ilyen irányú szerepét (Zimmermann *et al.*, 2005).

Ugyanakkor eredményeink éles ellentétben állnak azzal, hogy 10 μM ruténiumvörös vagy capsazepin a TRPV1-által közvetített hőválaszt transzfektált nem neuronális sejtekben erősen (Tominaga *et al.*, 1998), tenyésztett DRG neuronok forró ingerrel kiváltott ionáramát kisebb mértékben, de szignifikánsan gátolta (Kirschstein *et al.*, 1999; Nagy és Rang, 1999b; Savidge *et al.*, 2001). Utóbbival egybevágó adat, hogy a TRPV1-génhiányos egerekből származó DRG neuronok hővel kiváltott ionárama a 43–55 °C-os tartományban teljesen hiányzott (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2005).

Eredményeink – az irodalmi adatokkal egyetértésben – azt mutatják, hogy a forró ingerek transzdukciójának farmakológiája a TRPV1-antagonisták vonatkozásában nagymértékben különbözik a perifériás idegvégződéseken és a TRPV1-gyel transzfektált sejtekben, illetve tenyésztett DRG neuronok sejttestén. Ennek egyik lehetséges magyarázata, hogy míg a forró ingerre adott válaszban a TRPV1 szerepe a nociceptív primer afferens neuronok sejttestén (közel) kizárólagos, a perifériás végződésben csak minimális. Ennek hátterében az állhat, hogy a perifériás nociceptorokban a TRPV1-en kívül más – ruténiumvörössel nem blokkolható – hőérzékeny ioncsatorna vagy csatornák is expresszálódnak, amelyek redundáns hőszenzorként képesek átvenni a TRPV1 funkcióját annak farmakológiai blokkolása vagy genetikai hiánya esetén (a lehetséges jelölteket illetően lásd az 1.4.5 és 1.4.6. pontot).

3.6. Az in vitro kísérletek eredményei alapján levonható következtetések és fontosabb megállapítások

- 1./ A tartósabb bradikininexpozíció hőszenzibilizáló hatása izolált patkánybőr C polimodális nociceptorain COX-termékek által közvetített jelenség.
- 2./ A $\text{PGE}_2/\text{PGI}_2$ a szenzibilizáció fontos, de valószínűleg nem kizárólagos mediátorai.
- 3./ A flurbiprofen enantiomerei alkalmasak a COX-termékek mediátorszerepének kimutatására.
- 4./ Valószínűsíthető, hogy a bradikinin direkt akcióspotenciál-generáló hatással nem bír, az annak tartott hatás extrém fokú hőküszöbcsökkenés következménye, amely miatt a normál környezeti hőmérséklet folyamatos hőingerként hat. Számos más kémiai ágens (kapszaicin,

bradikinin, ATP, szerotonin, prosztaglandinok) is képes a hőküszöböt a normál környezeti hőmérséklet alá csökkenteni.

5./ A magas koncentrációban alkalmazott $\text{PGE}_2/\text{PGI}_2$ fokozta a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok számát az izolált patkánybőr C polimodális nociceptoraiban anélkül, hogy azok hőküszöbét megváltoztatta volna.

6./ A $\text{PGE}_2/\text{PGI}_2$ magas koncentrációban sem befolyásolta a forró ingerléssel (47°C) kiváltott iCGRP-felszabadulást izolált patkánybőrben, ellenben az alacsony pH-val (protonokkal) kiváltott válaszra facilitáló hatást fejtett ki.

7./ A PKA és a PKC farmakológiai aktiválása fokozta a forró ingerléssel kiváltott iCGRP-felszabadulást, ellenben az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció növelése gátló hatást fejtett ki.

8./ A peptiderg polimodális nociceptorok afferens (akciós potenciált generáló) és lokális efferens (neuropeptid-felszabadító) funkciójának $\text{PGE}_2/\text{PGI}_2$ általi szenzibilizálhatósága eltérő, ami a két folyamat eltérő ionális hátterével függhet össze.

9./ Az izolált patkánybőrben mért, forró ingerekkel kiváltott iCGRP-felszabadulást nem gátolta sem a ruténiumvörös, sem a capsazepin. Ennek alapján TRPV1-antagonisták vonatkozásában nagymértékben különbözik a forró ingerekre adott válasz a perifériás peptiderg idegvégződésekben és a TRPV1-gyel transzfektált sejtekben, illetve tenyésztett DRG neuronok sejttestén.

10./ A capsazepin magasabb koncentrációban fokozta mind a bazális, mind a hővel kiváltott iCGRP-felszabadulást, ami arra utal, hogy parciális agonistaként viselkedik a TRPV1-receptoron.

11./ Eredményeink támogatják azt a nézetet, hogy a forró ingerek transzdukciójában a nociceptív primer afferens neuronok sejttestén a TRPV1 szerepe kulcsfontosságú, ellenben a perifériás végződésben (legalábbis a patkány és egér lábán) minimális.

4. A MAGATARTÁSI NOCICEPTÍV HŐKÜSZÖB MÉRÉSÉRE ALKALMAS MŰSZEREK ÉS HŐKÜSZÖBCSÖKKENÉSEN ALAPULÓ TERMÁLIS ALLODYNIA-MODELLEK KIFEJLESZTÉSE ÉS VALIDÁLÁSA

4.1. Előzmények és célkitűzés

A bevezetésben (1.3.2. pont) részletesen volt szó arról, hogy a termonocicepció állatkísérletes vizsgálatában – számos hátrányuk ellenére – dominálnak a latenciaidő mérésén alapuló módszerek (forró lap, „tail-flick”, Hargreaves-féle plantárteszt). Bár történtek szórványos próbálkozások a nociceptív hőküszöb mérésén alapuló paradigmák kifejlesztésére, egyik módszert sem alkalmazták hosszabb távon, így a hőküszöbmérés nem vált a fájdalomtesztok repertoárjának részévé. Ebben szerepet játszhatott az a tény, hogy egyik készülékre sem fejlesztettek ki termális allodynia-modellt, azaz nem alkalmaztak olyan fizikai vagy kémiai stimulust, amely a nociceptív hőküszöböt lecsökkentette volna, termális allodynát eredményezve. Ismert, hogy a hiperalgégzia/allodynia állapotában az analgetikumok alacsonyabb dózisokban hatékonyak, mint a nem érzékenyített alapállapotban. Munkacsoportunk látott fantáziát a hőküszöbmérésben – elsősorban az elektrofiziológiailag meghatározott hőküszöbvel való összevethetőség miatt –, és célul tűzte ki a hőküszöb mérésére alkalmas készülékek kifejlesztését, valamint a hőküszöb csökkenésén alapuló különböző paradigmák kidolgozását és validálását.

Az ebbe a fejezetbe sorolt kísérleteknél számos metodikai elem tulajdonképpen az eredményekhez tartozik, emiatt leírásuknál kissé rendhagyó beosztást alkalmaztam. Egyes pontoknál – a könnyebb diszkutálhatóság érdekében – az eredmények és a megbeszélés pontokat összevontam, máshol azonban, ahol a konklúzió levonása többféle eredmény összevetésén alapul, megőriztem a hagyományos, elkülönült „Eredmények” és „Megbeszélés” pontokon alapuló struktúrát.

4.2. A nociceptív hőküszöb mérését alkalmazó patkánykísérletek közös metodikai elemei

A kísérleti protokollok megfeleltek a nemzetközi etikai útmutatásoknak (Zimmermann, 1983), és ezeket jóváhagyta a Pécsi Tudományegyetem Etikai Bizottsága. Kísérleteink zömét 140–200 g-os nőstény Wistar patkányokon (Charles River Hungary Ltd, Budapest) végeztük. Az állatokat a Pécsi Tudományegyetem állatházában tartottuk patogénmentes, légkondicionált

helyiségben 12 órás megvilágítást és a táphoz, illetve ivóvízhez *ad libitum* hozzáférést biztosítva. Az állatok a kísérletet megelőző napon kerültek a légkondicionált laboratóriumba, ahol a táp és a víz továbbra is *ad libitum* rendelkezésükre állt. A kísérletek folyamán mindig ugyanaz a személy kezelte az állatokat. Ekkor egy kondicionáló hőküszöbmérés (lásd lejjebb) történt adaptációs célból, amelynek eredményét nem használtuk fel az analízis során. A kísérlet napján két hőküszöbmérés történt 30 perces időközzel; ezek átlagát tekintettük a kiindulási, kontroll nociceptív hőküszöbnek.

Az analgetikumok vagy másfajta gátlószerek különféle stimulussal (RTX-injekció, hőtrauma vagy plantáris bemetszés) kiváltott hőküszöbcsökkenésre kifejtett gátló hatásának vizsgálata során mindig aktuális szolvenskontrollt használtunk: az állatcsoport egyik felét a vizsgált szerrel, a másik felét annak szolvensével kezeltük. Ez a módszer biztosította, hogy a stimulus (RTX, hőtrauma, plantáris bemetszés) hőküszöbcsökkentő hatásának variabilitása a különböző alkalmakkor használt állatpopulációkban a legkevésbé befolyásolja a szerek hatásának vizsgálatát. A hőküszöbmérést végző személy nem ismerte a kezelés fajtáját (aktív vagy szolvens). A szisztémás előkezelés mindig i.p. történt (0,3 ml/100 g térfogatban), az intraplantáris (i.pl.) injekciót 100 µl-es térfogatban adtuk. Az analgetikumok hőküszöbcsökkenést gátló hatását százalékban adtuk meg következő képlet segítségével: $(\text{Drop}_{\text{szolv}} - \text{Drop}_{\text{szer}}) / \text{Drop}_{\text{szolv}} \times 100$, ahol $\text{Drop}_{\text{szolv}}$ és $\text{Drop}_{\text{szer}}$ az adott stimulussal (RTX, hőtrauma, plantáris bemetszés) kiváltott hőküszöbcsökkenés átlagát jelenti a szolvenssel, illetve a szerrel kezelt állatokban egy adott időpontban vagy különböző időpontokban mért hőküszöbcsökkenések összegére vonatkozóan. A százalékos gátlás alapján dózis–hatás görbéket vettünk fel. Meghatároztuk a szerek minimális hatékony dózist (a legkisebb adott dózis, amely szignifikánsan gátolta a stimulus hőküszöbcsökkentő hatását) és ED_{50} -értékét (a szer maximális gátló hatásának a feléhez tartozó dózis).

A statisztikai analízis során Student-féle egymintás (párosított) t-próbát alkalmaztunk azokban az esetekben, amikor egy szerrel történt kezelés előtti és utáni hőküszöböket hasonlítottunk össze ugyanabban az állatpopulációban. Student-féle kétmintás (párosítatlan) t-próbát használtunk akkor, ha az állatcsoport egyik felét a vizsgált szerrel, a másik felét annak szolvensével kezeltük, és a két csoportban – valamilyen, hőküszöbcsökkenést kiváltó ágens hatására – egy adott időpontban kialakuló hőküszöbcsökkenések összehasonlítása történt. Egyszempontos ANOVA utáni Newman–Keuls *post hoc* teszt alkalmazására került sor azokban az esetekben, amikor ugyanabban az állatcsoportban különböző időpontokban mért hőküszöböket hasonlítottunk össze kezeletlen vagy a hőküszöbcsökkentő stimulusnak (RTX, hőtrauma, plantáris bemetszés) kitett állatokban. Kétszempontos ANOVA-t követő Newman–

Keuls *post hoc* tesztet használtunk azokban az esetekben, amikor a szerrel, illetve annak szolvensével kezelt két állatcsoportban a különböző időpontokban mért – kémiai vagy fizikai stimulussal kiváltott – hőküszöbcsökkenéseket hasonlítottuk össze.

A morfin-klorid (Ph. Hg. VII, PTE Egyetemi Gyógyszertár, Pécs), a diclofenac-nátrium (Research Biochemicals International, Natick, USA) és az ibuprofen-nátrium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) oldása és hígítása fiziológiás sóoldattal történt. A paracetamol (Ph. Hg. VII, PTE Egyetemi Gyógyszertár) 12,5% 1,2-propándiolban oldottuk fel, és fiziológiás sóoldattal hígítottuk. Az RTX-et (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) és az I-RTX-et (Tocris Cookson, LTD, UK) etanolban oldottuk fel, és a 1 mg/ml-es törzsoldatot fiziológiás sóoldattal hígítottuk. Az α,β -metilén-ATP és a piridoxál-foszfát-6-azofenil-2',4'-diszulfonát (PPADS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) oldása és hígítása fiziológiás sóoldattal történt. Az SB705498, a BCTC és az AMG9810 szintézise a Richter Gedeon NyRT-ben történt. Mindhárom vegyület tisztasági foka legalább 99% volt. Minden dózis 5% Tween 80-at tartalmazó fiziológiás sóoldattal készült.

4.3. Az emelkedő hőmérsékletű forró lap és a resiniferatoxinral kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-modell validálása patkányban

4.3.1. Célkitűzés

Egy számítógéppel vezérelt, emelkedő hőmérsékletű forró lap kifejlesztését és validálását tűztük ki célul. Ehhez a pécsi Supertech Kft. biztosította a műszaki-technikai támogatást. A készülék validálása során vizsgáltuk a hőküszöb reprodukálhatóságát, referencia-analgetikumok iránt érzékenységet mind alapállapotban, mind hőküszöbcsökkenéssel járó termális allodyniában.

4.3.2. Módszerek

A nociceptív hőküszöb mérése az emelkedő hőmérsékletű forró lappal és a kontroll hőküszöb farmakológiai modulációjának vizsgálata

Az emelkedő hőmérsékletű forró lap három részből állt: fűtőegység (20-szor 15 cm-es fémlap), amely alatt volt a fűtőegység, felette pedig a plexiből készült megfigyelő kamra (**25. ábra**), vezérlőegység, személyi számítógép. A speciális célprogram lehetővé tette a fémlap fűtését különböző fűtési sebességek megválasztásával. Ellenőrző mérések szerint a fűtés közel egyenletes volt, és a fémlap különböző pontjain termoelemmel egyidejűleg mért hőmérsékletek eltérése kisebb volt, mint 0,5 °C. A „cut-off” hőmérséklet 50 °C volt.

A hőküszöbmérés során az állatokat a készülék fémlapja feletti megfigyelő kamrába helyeztük 30 °C-os kiindulási laphőmérséklet mellett. Ezután a lapot számítógépes vezérlés segítségével egyenletesen, 6 °C/perc sebességgel fűtöttük mindaddig, amíg az állat valamely végtagján nocifenzív reakció meg nem jelent. Ekkor az állatot azonnal kiemeltük a kamrából, a fűtést megszakítottuk, majd a lapot jéghideg acélfedő ráhelyezésével 30 °C alá hűtöttük. A típusos nociceptív válaszreakció valamelyik hátsó láb nyalása volt, a végtag rázása, megemelése, vagy az állat felugrása ritkán volt megfigyelhető. Azt a laphőmérsékletet, amelyik a fenti reakciók bármelyikét kiváltotta bármely lábon, tekintettük a nociceptív hőküszöbnek. A küszöbmérést 30 perc múlva megismételtük, és a két küszöb átlaga adta a kiindulási (kontroll vagy alap) nociceptív hőküszöböt. A hőküszöb reprodukálhatóságát vizsgáló, limitált számú kísérletben mindkét hátsó végtag hőküszöbét meghatároztuk: az egyik láb nocifenzív reakciójának bekövetkezése után tovább folytattuk a lap fűtését mindaddig, amíg a másik láb is reakciót nem mutatott. Limitált számban 28–42 g-os nőstény C57BL6 egereken (vad típusú, illetve TRPV1-génhiányos) is végeztünk hőküszöbmérést. A vad típusú egereket a Charles River Hungary Ltd, Budapest szállította. A TRPV1 KO egereket dr. John B. Davis (GlaxoSmithKline, Harlow, UK) ajándékként bocsátotta rendelkezésünkre. A küszöbmérés egérben hasonló módon történt, mint a patkányoknál, a tipikus válaszreakció valamely hátsó végtag nyalása vagy rázása volt.



25. ábra. Az emelkedő hőmérsékletű forró lap (Supertech Kft) fűtőfelülete a megfigyelő kamrával és benne a típusos nocifenzív reakciót mutató patkánnyal.

Az analgetikumok alap hőküszöbre kifejtett hatásainak vizsgálata során a kontroll hőküszöb meghatározása után az állatcsoport egyik felét a vizsgált szerrel, a másik felét annak szolvanséval kezeltük i.p. (0,3 ml/100 g). 30 perccel később megismételtük a hőküszöbmérést. A szerek hatását a kezelés utáni és előtti hőküszöbök statisztikai összehasonlításával vizsgáltuk.

Az RTX nociceptív hőküszöbre kifejtett akut hatásának, valamint e hatás farmakológiai modulációjának vizsgálata

Ezekben a kísérletekben az egyik hátsó végtag nociceptív küszöbét mértük 15 °C-os kiindulási laphőmérséklet és 12 °C/perc fűtési sebesség alkalmazásával (a mérési paraméterek változtatását az RTX masszív küszöbcsökkentő hatása tette szükségessé). Az első mérés esetén a lapot addig fűtöttük, amíg bármelyik hátsó végtag nocifenzív reakciót nem mutatott. A 30 perccel később megismételt mérés során addig fűtöttük a lapot, amíg annak a lábnak a reakciója be nem következett, amelyik az első méréskor mutatott reakciót. A két küszöbérték átlaga szolgáltatta a vizsgált láb kontroll hőküszöbét. Ezután 0,048 nmól RTX-et vagy annak szolvensét adtunk intraplantáris injekció formájában, majd 5, 10, 15, 20 és 25 perc múlva megismételtük mindkét hátsó láb hőküszöbének mérését.

Az analgetikumok RTX-indukálta hőküszöbcsökkenésre kifejtett hatásának vizsgálata során mindig aktuális szolvenskontrollt használtunk (lásd 4.2. pont): az RTX injekciója előtt 25 perccel az állatcsoport egyik felét a vizsgált szerrel, a másik felét annak szolvensével kezeltük. Az RTX adása után 5, 10, 15 és 20 perccel megismételtük a kezelt láb hőküszöbének mérését.

Az RTX nociceptív hőküszöbre kifejtett hosszú távú hatásának vizsgálata

Az állatok mindkét hátsó lábába 0,048 nmól RTX-et vagy annak szolvensét adtunk intraplantáris injekció formájában, majd 5, 10, 15, 20 és 25 perc múlva, valamint 1, 2, 4, 6 és 24 óra elteltével, majd naponként (1 héten át) megismételtük a hőküszöbmérést az elsőként reagáló lábra vonatkozóan. Ha elértük a „cut-off” értéket, az állatot eltávolítottuk a lapról, és 50 °C-nak vettük a küszöböt. A kétoldali kezelésre azért volt szükség, hogy elkerüljük a nem kezelt láb égési sérülését, amely abból származott volna, hogy az RTX hosszú távú hatásként megemeli a hőküszöböt.

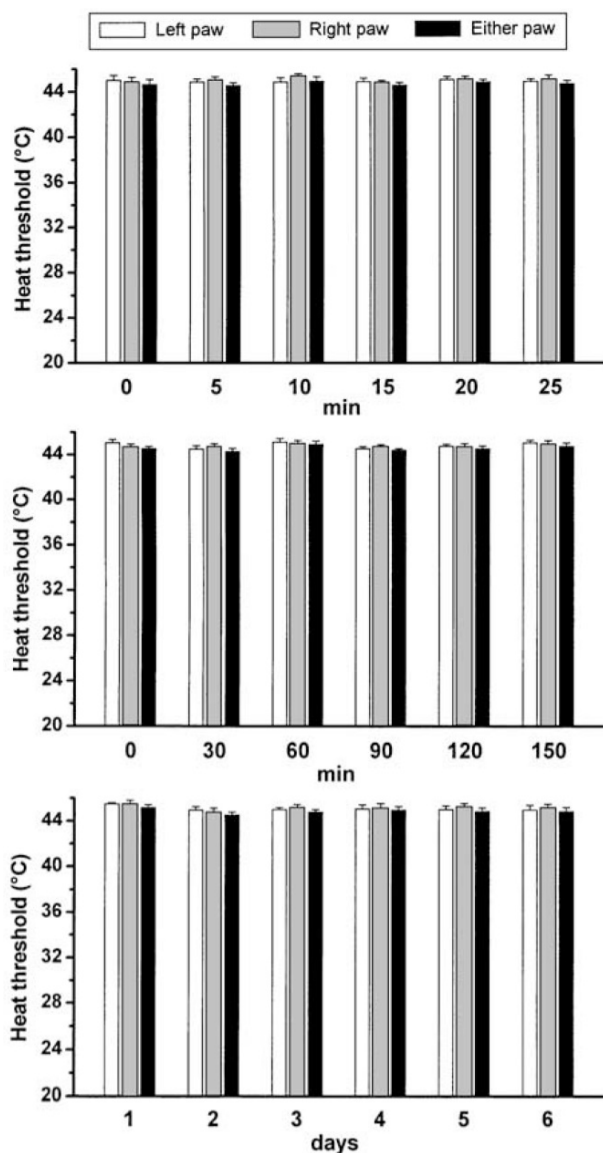
A jód-resiniferatoxin (I-RTX) nociceptív hőküszöbre kifejtett hatásának vizsgálata kontroll, illetve szenzibilizált állatokban

Az I-RTX akut és hosszú távú hatását vizsgáló kísérletekben 0,1 illetve 1 nmól szer kétoldali intraplantáris injekcióját (100 µl) követően ugyanazon időpontokban és ugyanazon paraméterekkel történt hőküszöbmérés az elsőként reagáló lábra vonatkozóan, mint az RTX esetében (lásd fent). További kísérletekben azt vizsgáltuk, hogy az I-RTX-szel történt intraplantáris előkezelés (0,05 nmól, 50 µl) hogyan befolyásolja az 5 perccel később szintén intraplantárisan adott RTX (0,048 nmól, 100 µl), illetve α,β -metilén-ATP (0,3 µmól, 100 µl) hőküszöbcsökkentő hatását.

4.3.3. Eredmények és megbeszélés

Az emelkedő hőmérsékletű forró lappal mért nociceptív hőküszöb reprodukálhatósága

A kezeletlen patkányok hátsó lábán mért nociceptív hőküszöb $45,3 \pm 0,3$ °C ($n=36$) volt. A hőküszöbmérés adott állatcsoporton belüli variabilitásának vizsgálata során 3 állatcsoportban ($n=12-12$) 5 percenként, 30 percenként, illetve naponként ismételtük a hőküszöb mérést mindkét hátsó végtagon 6–6 alkalommal (**26. ábra**). Ezen eredmények statisztikai analízise során nem találtunk szignifikáns különbséget (i) ugyanazon láb különböző időpontokban mért küszöbei között; (ii) az állat különböző időpontokban mért nociceptív küszöbértékei között (a két láb küszöbértéke közül az alacsonyabbat tekintettük az állat küszöbének); (iii) a bal és jobb láb egyazon időpontban mért küszöbértékei között.

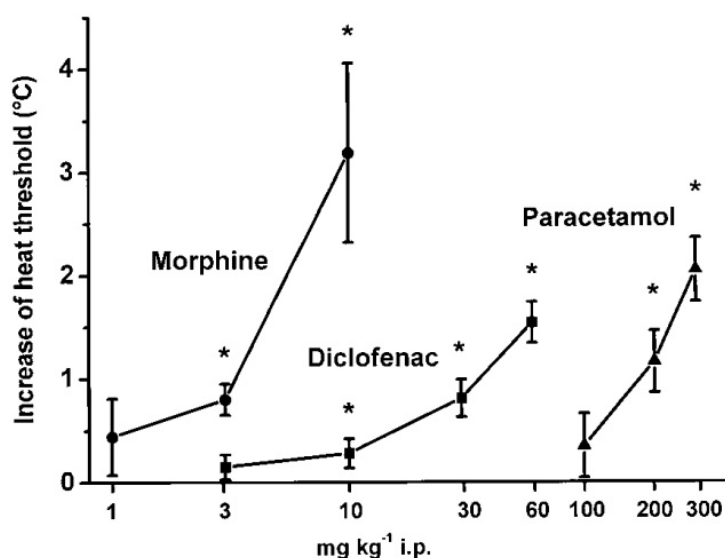


26. ábra. A nociceptív hőküszöb reprodukálhatósága ismételt mérések során három különböző patkánycsoportban. A bármelyik lábra vonatkozó hőküszöb (fekete oszlopok) a bal és a jobb láb küszöbe közül az alacsonyabbat jelenti, és az egész állat küszöbét reprezentálja. A fűtési sebesség 12 °C/perc volt az első csoportban (felső panel), míg 6 °C/perc a második és a harmadik csoportban (középső és alsó panel). Az adatok átlag \pm SEM értékek ($n=12$) mindegyik csoport esetében. A statisztikai analízis nem talált szignifikáns különbséget ugyanazon láb vagy az egész állat (bármelyik lábként jelölt) különböző időpontokban mért hőküszöbe között (egyszempontos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt), illetve a bal és a jobb láb ugyanazon időpontban mért hőküszöbe között (Student-féle kétmintás t-próba).

A különböző alkalmakkor használt állatcsoportok kontroll küszöbértékei sem mutattak jelentős ingadozást (adatokat nem mutatunk), jelezve, hogy a nociceptív hőküszöb állatcsoportok közötti variabilitása szintén minimális. Mindez a nociceptív hőküszöbmérés jó reprodukálhatóságát jelzi. Megjegyzendő, hogy az állandó hőmérsékletű forró lappal mért latenciaidő rövidül az ismételt mérések során (Gamble és Milne, 1989; Plone *et al.*, 1996; Sandkühler *et al.*, 1996). Ennek hátterében az állhat, hogy a küszöbfeletti hőinger hatására a nociceptív idegvégződések szenzibilizálódhatnak a forró ingerekkel szemben (Perl *et al.*, 1976; Meyer és Campbell, 1981; Lyfenko *et al.*, 2002). A hőküszöb stabilitása annak lehet a következménye, hogy a küszöbingerek – szemben a küszöb felettiakkal – kisebb mértékű nociceptor-aktivációt okoznak, amely nem vált ki olyan utóhatást a nociceptorokban, ami az ismételt ingerre adott választ módosítaná akár a szenzibilizáció, akár a deszenzibilizáció irányába.

Referencia-analgetikumok hatása a nociceptív hőküszöbre

A szisztémásan adott morfin, diclofenac és paracetamol egyaránt dózisfüggő módon megemelte a nociceptív hőküszöböt (27. ábra). Mivel egyik vegyület oldószere sem okozott szignifikáns hőküszöbváltozást (adatot nem mutatunk), a szerek hatásainak statisztikai elemzése során a kezelés előtti és utáni hőküszöböket hasonlítottuk össze. A morfin bizonyult a leghatékonyabbnak és egyben a legpotensebbnek (mg alapon) is; a diclofenac és a paracetamol



27. ábra. A morfin, diclofenac, illetve paracetamol hatása a nociceptív hőküszöbre i.p. adás után 30 perccel mérve. A hőküszöb-emelkedés a szer adása utáni és a kiindulási (kontroll) küszöb közötti különbséget jelenti. Az adatok átlag±SEM értékek (n=12). Mivel egyik szer szer szolvense sem befolyásolta szignifikánsan a hőküszöböt, a szer adása előtti és utáni hőküszöböket a Student-féle egymintás t-próbával hasonlítottuk össze. A csillagok statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket jeleznek.

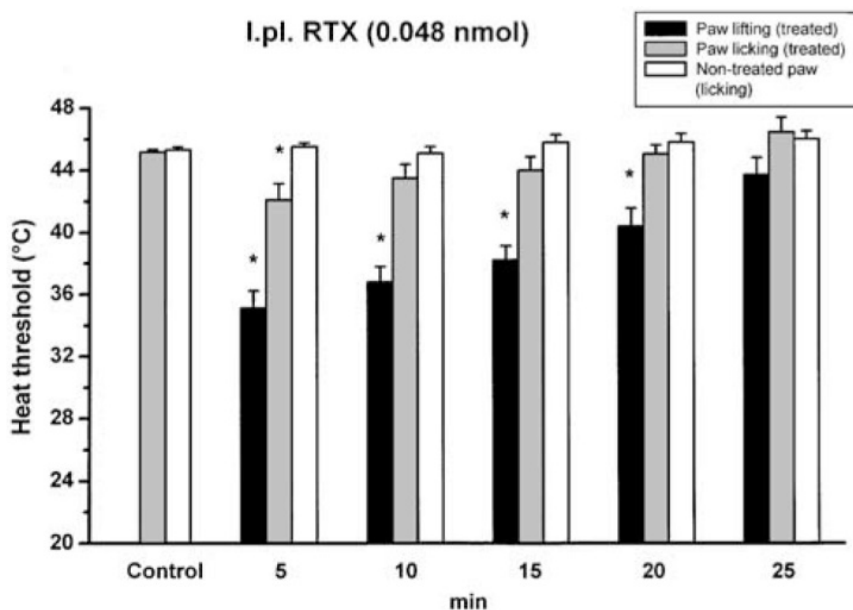
hatékonysága hasonlóan adódott, a diclofenac nagyobb hatásereje mellett. A szerek minimális hatékony dózist (a legkisebb adott dózis, amely szignifikáns küszöbemelkedést okozott) és az 1 °C-os küszöbemelkedésnek megfelelő (számított) dózist az **4. táblázat** tartalmazza. A morfinnal és paracetamollal nyert eredményeink egybevágóak Hunskaar és munkatársai (1986) saját fejlesztésű emelkedő hőmérsékletű forró lapjával mért adataival. A 10 mg/kg diclofenac szignifikáns hőküszöbemelő hatása figyelemreméltó, mivel a hagyományos forró lappal 100 mg/kg dóziséig egyetlen vizsgálatban sem tapasztaltak latenciamegnyúlást (Bjorkman *et al.*, 1990; Engelhardt *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 1998), míg a paracetamol esetében ellentmondásos eredményeket kaptak (Pini *et al.*, 1996; Amabeoku *et al.*, 2000; Kouadio *et al.*, 2000; Sandrini *et al.*, 2001). A morfin minimális hatékony dózisa hasonlóan adódott, mint az állandó hőmérsékletű forró lap esetében (lásd Vogel és Vogel, 1997; Le Bars *et al.*, 2001).

Az RTX akut hatása a nociceptív hőküszöbre

Az RTX szolvensének (100 µl 0,03%-os etanol fiziológiás sóoldatban) intraplantáris injekciója nem okozott semmiféle nocifenzív reakciót, az emelkedő hőmérsékletű forró lapon pedig a szokásos nyalási reakció volt megfigyelhető a kontrollhoz képest változatlan hőküszöbérték mellett (adatokat nem mutatunk). Az RTX intraplantáris injekciója (0,048 nmól) típusosan maximum 5 percig tartó nocifenzív reakciót váltott ki, amely a talp nyalásában, harapásában, ritkán annak emelésében nyilvánult meg. Ennek lezajlása után az emelkedő hőmérsékletű forró lapon tesztelve az első nocifenzív reakció a láb emelése volt (ami nem kezelt állatoknál nagyon ritkán fordult elő). Ez a válasz az esetek egy részében ismétlődő, fázikus reakció volt, máskor pedig folyamatos, több másodpercig tartó. A lábemelési reakció 34–41 °C-os laphőmérsékletnél következett be, majd 4–6 °C-kal magasabb hőmérsékletnél jelent meg a láb nyalási reakciója (**28. ábra**). Mindkét reakcióra nézve a hőküszöb 5 perccel az RTX adása után volt a legalacsonyabb, és fokozatosan tért vissza a kontroll értékre a 25. percre. A nem kezelt láb csak a nyalási reakciót mutatta, a kontrollhoz képest változatlan küszöbérték mellett, jelezve, hogy az RTX hatása lokális volt. Az I-RTX-szel történt intraplantáris előkezelés (0,05 nmól, 5 perccel az RTX-injekció előtt) szignifikánsan gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását, igazolva a TRPV1-receptor közvetítő szerepét (**32. ábra**).

Elsőként tudtuk kimutatni TRPV1-agonista nociceptív hőküszöböt csökkentő hatását éber állatban. Az RTX masszív hőküszöbcsökkentő hatása összecseng azzal, hogy a kapszaicin is ki tud váltani termális szenzibilizációt. Emberben a bőrre adva a nociceptív hőküszöböt a 30–31 °C-os tartományba viszi le, és intradermálisan alkalmazva hiperalgéziát indukál (Szolcsányi,

1977; Simone *et al.*, 1987). Patkányban intraplantáris vagy topikális adás esetén a lábviasszahúzási latencia rövidülését váltja ki (Gilchrist *et al.*, 1996; Yeomans *et al.*, 1996).



28. ábra. Az egyik oldali lábba adott RTX (0,048 nmól) hatása a nociceptív hőküszöbre. Az adatok átlag±SEM értékek (n=12). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jeleznek a kezelt láb kontroll küszöbéhez képest (p<0,05, egyszempontos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt). Az RTX szolvense (100 µl 0,03%-os etanol fiziológiás sóoldatban) nem módosította a hőküszöböt, és csak a láb nyalási reakciója volt megfigyelhető a szolvenssel kezelt állatokban (adatot nem mutatunk).

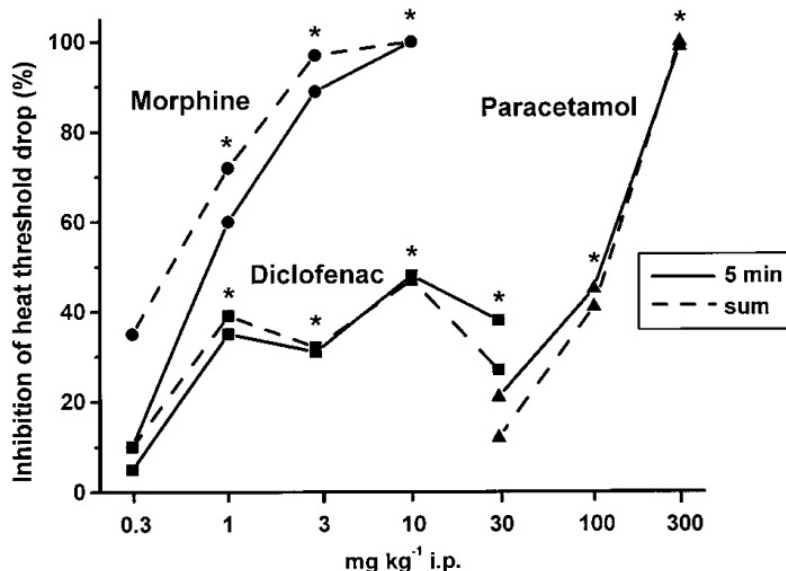
Egyrost-elvezetéses, illetve izolált szenzoros neuronokon végzett „patch-clamp” kísérletekben is kimutatták a kapszaicin termális szenzibilizáló hatását (Kirchstein *et al.*, 1997; Günther *et al.*, 1999; Vyklicky *et al.*, 1999).

Érdekes módon az RTX hatása alatt az emelkedő hőmérsékletű forró lapon egy új fajta reakció, a láb emelése volt az első nocifenzív válasz, amelyet magasabb hőmérsékletnél követett az alaphelyzetben tipikus nyalási reakció. Az RTX okozta küszöbcsökkenést hőallodynaiaként értelmezhetjük, hiszen normál körülmények között a 34–41 °C-os hőmérsékleti ingerek nem váltanak ki nocifenzív reakciót. Valójában minden olyan módszernél, ahol a termális, mechanikai vagy kémiai nociceptív küszöb mérése történik, az érzékenyített állapot, amely a küszöb csökkenésével jár, allodynaiaként értelmezendő. Ezzel szemben a latenciamérésen alapuló módszereknél nem lehetséges a hiperalgéria és az allodynia megkülönböztetése, hiszen mindig küszöbfeletti ingert alkalmaznak.

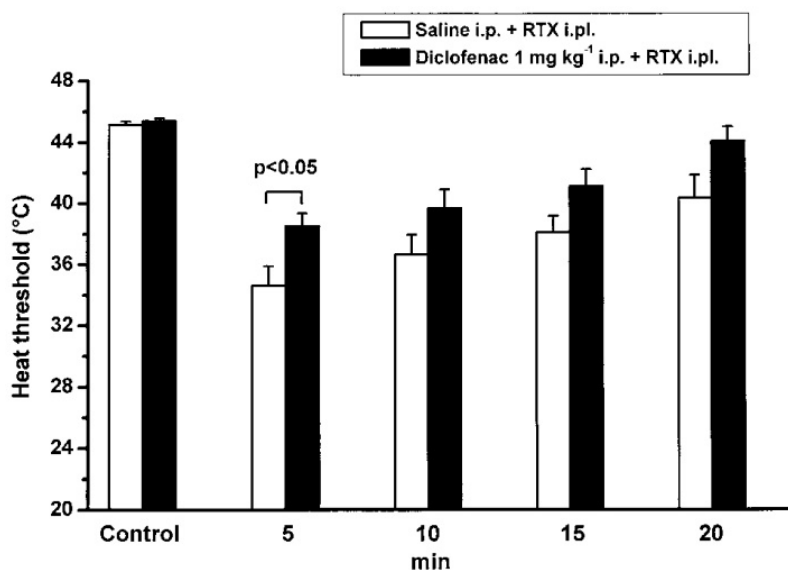
Referencia-analgetikumok hatása az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenésre

A szisztémásan adott morfin, diclofenac és paracetamol egyaránt gátolta az RTX-szel kiváltott nociceptív hőküszöbcsökkenést mind a négy mérési időpontban a szolvenssel

összehasonlítva (29. ábra). Az analgetikumok gátló hatásának jellemzésére két paramétert használtunk: az 5. percben mért hőküszöbcsökkenés az RTX hatásának maximumát jelenti, míg az 5., 10., 15. és 20. percben mért hőküszöbcsökkenések összege integratív paraméterként a teljes RTX-hatást tükrözi. A gátlást százalékban adtuk meg a 4.2. pontban tárgyalt képlet segítségével mindkét paraméterre. A 30. ábra példaként mutatja az 1 mg/kg diclofenac hatását.



29. ábra. Dózis-hatás összefüggés a morfin, diclofenac és paracetamol előkezelés (i.p., 25 perccel az RTX adása előtt) RTX-allodyniára (hőküszöbcsökkenésre) kifejtett, százalékban megadott gátló hatására vonatkozóan (n=10–12 mindegyik csoportban). A folyamos vonal az 5. percben mért küszöbcsökkenésre, a szaggatott vonal az 5., 10., 15. és 20. percben mért küszöbcsökkenések összegére vonatkozik. A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket ($p < 0,05$, Student-féle kétmintás t-próba) jeleznek a szolvenshez képest (minden szernél mindkét vonal pontjaira vonatkoznak).



30. ábra. A diclofenac-előkezelés (1 mg/kg i.p., 25 perccel az RTX adása előtt) hatása az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenésre. Az adatok az RTX-szel kezelt láb küszöbértékei átlag±SEM formában (n=12 mindkét csoportban). A diclofenac hatása szignifikáns ($p < 0,05$, Student-féle kétmintás t-próba) volt a szolvenséhez képest mind az 5. percben mért küszöbcsökkenésre, mind az 5., 10., 15. és 20. percben mért küszöbcsökkenések összegére vonatkozóan.

A kétféle paraméter alapján nyert dózis–hatás görbék hasonlóak, azonos minimális hatékony dózissal mindhárom szerre vonatkozóan. A morfin és a paracetamol görbéje meredek, 100%-ot elérő gátlással. Ezzel szemben a diclofenac maximális gátló hatása csak 40% körüli érték, és a görbe relatíve lapos. A dózis–hatás görbék alapján meghatározott minimális hatékony dózisokat és ED₅₀-értékeket az **4. táblázat** tartalmazza. Eszerint mindhárom szer minimális hatékony dózisa az antiallodyniás hatásra nézve jóval alacsonyabb, mint a kontroll hőküszöb emelkedésére vonatkozóan. Emiatt az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenés gátlásán alapuló nociceptív teszt érzékenyebb paradigma a morfin, diclofenac és paracetamol termális antinociceptív hatásának kimutatására, mint a kontroll küszöb megemelésén alapuló vizsgálat. Hangsúlyozandó, hogy a morfin és a diclofenac minimális hatékony antiallodyniás dózisa közel van a klinikai gyakorlatban használt humán dózisokhoz, ami szintén a paradigma farmakológiai érzékenységét jelzi.

4. táblázat. *A morfin, diclofenac és paracetamol hatékony dózisa a kontroll hőküszöb emelésére és az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenés gátlására vonatkozóan.*

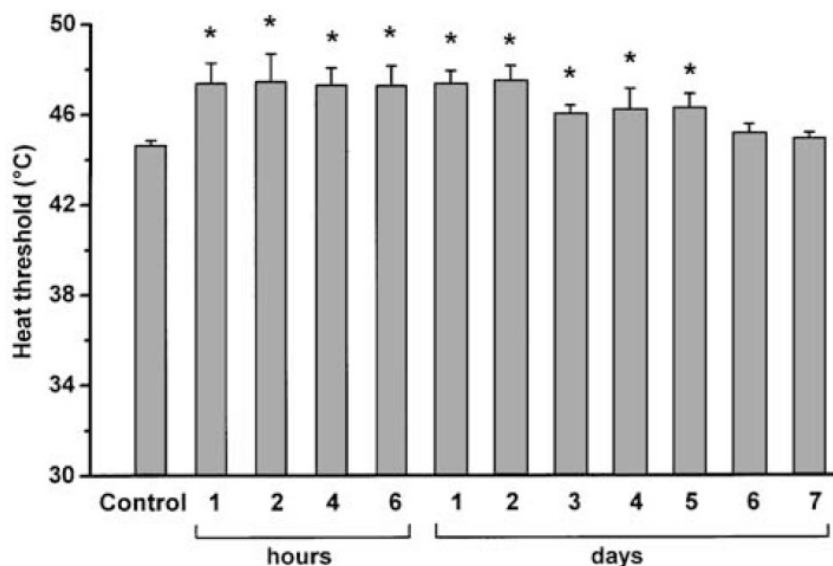
	<i>Morphine</i>		<i>Diclofenac</i>		<i>Paracetamol</i>	
Elevation of the heat threshold	Minimum effective dose (mg kg ⁻¹)	ED _{1°C} (mg kg ⁻¹)	Minimum effective dose (mg kg ⁻¹)	ED _{1°C} (mg kg ⁻¹)	Minimum effective dose (mg kg ⁻¹)	ED _{1°C} (mg kg ⁻¹)
	3	4.5	10	40	200	160
Inhibition of the RTX-induced threshold drop	Minimum effective dose (mg kg ⁻¹)	ED ₅₀ (mg kg ⁻¹)	Minimum effective dose (mg kg ⁻¹)	ED ₅₀ (mg kg ⁻¹)	Minimum effective dose (mg kg ⁻¹)	ED ₅₀ (mg kg ⁻¹)
	1	0.8	1	0.7	100	120
	1	0.5	1	0.6	100	115

Minimális hatékony dózis: a legkisebb adott dózis, amely szignifikánsan növelte a kontroll hőküszöböt, illetve szignifikánsan gátolta az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenést. ED_{1°C}: az 1 °C-os küszöbemelkedésnek megfelelő dózis. ED₅₀: az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenés maximuma 50%-os gátlásának megfelelő dózis. Ez utóbbi értékeket az 5. percben mért hőküszöbcsökkenésre (felső szám) vagy az 5., 10., 15. és 20. percben mért hőküszöbcsökkenések összegére (alsó szám) vonatkozóan adtuk meg.

Az RTX hőküszöbcsökkentő hatásának fázikus jellege (gyorsan kialakuló és rövid hatás) valószínűtlenné teszi, hogy a válasz során számottevő mértékű gyulladásos reakció alakuljon ki. Emiatt a diclofenac hatása primer antinociceptív hatásként értékelendő, és nem tekinthető a gyulladásgátló hatás következményének. Ebből a szempontból az RTX-hőallodynia-modell előnyös, mivel számos más használatos hiperalgéria-modellben (pl. carregenin, Freund-adjuváns) jelentős gyulladásos komponenssel kell számolni, ami akadályozza a gyulladásgátló és az antinociceptív hatások elkülönítését.

Az RTX hosszú távú hatása a nociceptív hőküszöbre

Az RTX szolvensének injekciója mindkét hátsó láb talpába sem rövid távú (5–30 perc), hosszú távú (1 óra–7 nap) változást nem okozott a nociceptív hőküszöbben (adatokat nem mutatunk), amely kiváló reprodukálhatósága miatt naponkénti mérésekre is alkalmas (lásd **26. ábra, alsó panel**). A szintén bilaterálisan adott RTX (0,048 nmól/láb) hatására nocifenzív reakció lépett fel mindkét lábon (kevesebb, mint 5 percig), majd ennek lecsengése után a nociceptív hőküszöb 20 perces időtartamra lecsökkent (a részleteket lásd feljebb, az egyoldali RTX-injekció hatásainak leírásánál). Egy órával az RTX-adás után szignifikáns hőküszöb-emelkedést mértünk, ami hasonló mértékben jelentkezett a 2., 4. és 6. órában, majd ezt követően az 5. napig (**31. ábra**). Ezen teljes időszakban a lábemelési reakciót egyetlen esetben sem tapasztaltuk, az állatok mindig valamely hátsó láb nyalásával reagáltak a termális ingerlésre. A maximális hőküszöb-emelkedés 3 °C körüli volt. Az 1 óra után mért tartós, de reverzibilis hőküszöb-emelkedést az RTX idegvégződés-szintű deszenzibilizáló hatásaként értelmezhetjük (lásd 1.4.1.5. pont), mivel a bazális nociceptív hőküszöb meghatározásában patkány talpán a TRPV1-nek nincs szerepe (lásd lejjebb az I-RTX hatásának hiányát a hőküszöbre és a 4.6.3. pontot). Hasonló hatást írt le a kapszaicinre Szolcsányi (1985; 1987b) az általa kifejlesztett módszerrel, amely csak a nociceptív hőküszöb hozzávetőleges meghatározását tette lehetővé (lásd 1.3.5. pont). A hagyományos forró lappal, illetve a „tail-flick” módszerrel vizsgálva egyes



31. ábra. A kétoldali intraplantáris RTX-injekció (0,048 nmól/láb) hosszú távú hatása a nociceptív hőküszöbre. Az adatok átlag±SEM értékek (n=12). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jeleznek a kontroll küszöbhez képest ($p < 0,05$, egyszempontos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt). Az RTX szintén bilaterálisan adott szolvense (100 µl 0,03%-os etanol fiziológiás sóoldatban) nem befolyásolta szignifikánsan a hőküszöböt (adatokat nem mutatunk).

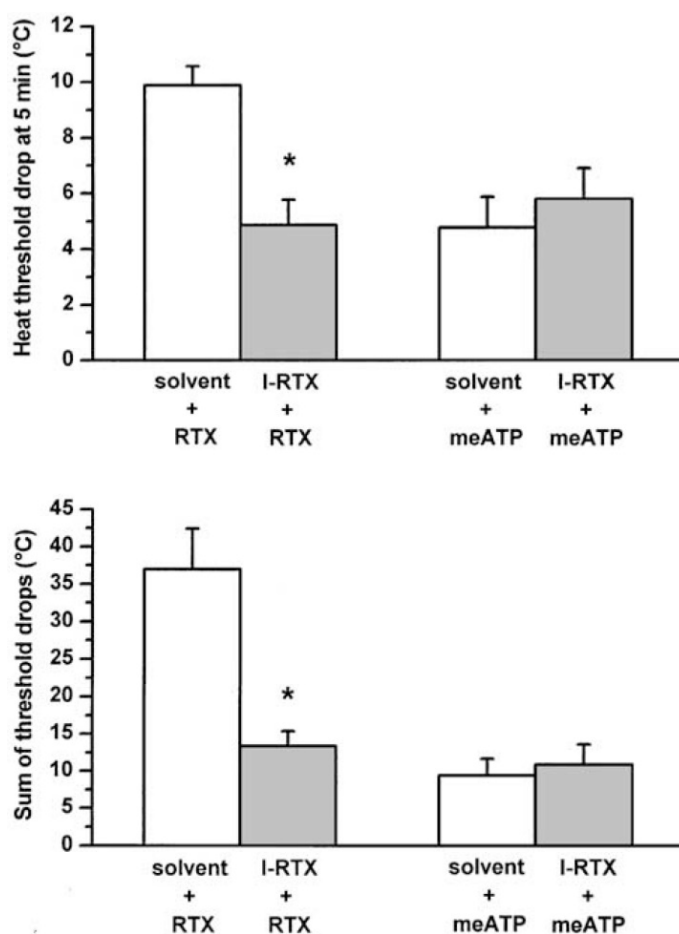
vizsgálatokban ki tudták mutatni a kapszaicin termális antinociceptív hatását, másokban azonban nem (Szolcsányi, 1976; 1985; Obál *et al.*, 1979; Hayes és Tyers, 1980; Gamse, 1982; Bittner és Lahann, 1984), noha a szer deszenzibilizáló hatását elektrofiziológiai kísérletekben egyértelműen sikerült demonstrálni (Szolcsányi, 1987a; 1987b; Szolcsányi, 1990). Mindezek alapján elmondható, hogy a nociceptív hőküszöb mérése alkalmas a TRPV1-agonisták szenzoros deszenzibilizáló hatásának *in vivo* vizsgálatára (a további kísérleteket lásd az 5.7. pontban).

Az I-RTX és az α,β -metilén-ATP hőküszöbvel kapcsolatos hatásai

A TRPV1-receptor-antagonista I-RTX (Wahl *et al.*, 2001; Undem és Kollarik, 2002) intraplantáris injekciója (0,1 és 1 nmol) nem váltott ki sem nocifenzív reakciót, sem hőküszöbváltozást sem akutan, az 5–60. perc során, sem hosszú távon, 1–5 napig vizsgálva (adatokat nem mutatunk). Az *in vitro* adatoknak (Wahl *et al.*, 2001; Undem és Kollarik, 2002) megfelelően nem valószínűsíthető, hogy az I-RTX parciális agonista lenne a TRPV1-receptoron, hiszen nem váltott ki sem nocifenzív reakciót, sem akut hőküszöbcsökkenést. A TRPV1-agonista RTX-szé való számottevő átalakulása sem tételezhető fel, mert hosszú távon nem váltott ki hőküszöb-emelkedést. Az I-RTX akut hőküszöbemelő hatásának hiánya arra utal, hogy a TRPV1 nem vesz részt a nociceptív hőküszöb beállításában a patkány talpán (hasonlóan az egér talpához, lásd lejjebb).

Az intraplantáris I-RTX-előkezelés (0,05 nmol, 5 perccel az RTX előtt) több mint 50%-kal csökkentette a talpba adott RTX hőküszöbcsökkentő hatását mind az 5 perces mérés, mind a hőküszöbcsökkenések összege alapján (**32. ábra**). Ez igazolja az I-RTX *in vivo* TRPV1-antagonista hatását. Az α,β -metilén-ATP intraplantáris injekciója (0,3 μ mol) szintén hőküszöbcsökkenést váltott ki az 5. percben $39,5 \pm 1,2$ °C; a 10. percben $42,0 \pm 0,9$ °C-os küszöbértéket eredményezve ($n=8$, $p<0,05$ mindkettőnél egyszempontos ANOVA utáni Newman–Keuls-tesztel vizsgálva). A P2-purinoceptorokat blokkoló PPADS (0,15 μ mol i.pl. , 5 perccel korábban) szignifikánsan, 83%-kal gátolta az α,β -metilén-ATP hőküszöbcsökkentő hatását az 5. percben a szolvenséhez képest ($n=8$, $p<0,01$, Student-féle kétmintás t-próba), igazolva a P2-purinoceptorok közvetítő szerepét. Az α,β -metilén-ATP hőküszöbcsökkentő hatása összhangban van az ATP és analógjainak a plantárteszttel kimutatott termális hiperalgéziát okozó hatásával (Hamilton *et al.*, 1999). Mivel az I-RTX-előkezelés nem befolyásolta az α,β -metilén-ATP hőküszöbcsökkentő hatását (**32. ábra**), kizárható, hogy a TRPV1-receptorbloktól független, pl. helyi érzéstelenítő hatása lenne. Eredményeink alapján elmondható, hogy az emelkedő hőmérsékletű forró lap az RTX-allodynia-moddal alkalmas nemcsak TRPV1-

receptor-agonisták, hanem -antagonisták *in vivo* vizsgálatára is (a TRPV1-antagonistákkal kapcsolatos további kísérleteink leírását lásd a 4.6. pontban).



32. ábra. A jód-resiniferatoxin (I-RTX, 0,05 nmól/láb) hatása az RTX-szel (0,048 nmól/láb) és az α - β -metilén-ATP-vel (meATP, 0,3 mmól/láb) kiváltott hőküszöbcsökkenésre az 5. percben mért küszöbcsökkenés (felső panel), illetve az 5., 10., 15. és 20. percben (RTX után), valamint az 5. és 10. percben (meATP után) mért küszöbcsökkenések összege (alsó panel) alapján. Az adatok átlag \pm SEM értékek (n=8). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket ($p < 0,05$, Student-féle kétmintás t-próba) jeleznek a szolvenshez képest.

Vad típusú és TRPV1-génhiányos egerek hőküszöbének összehasonlítása

Nem találtunk szignifikáns eltérést a TRPV1-génhiányos és a vad típusú egerek nociceptív hőküszöbe között ($45,6 \pm 0,5$ versus $45,2 \pm 0,4$ °C, n=10, $p=0,76$, Student-féle kétmintás t-próba). Ez arra utal, hogy alaphelyzetben a TRPV1-receptor nem járul hozzá egér hátsó lábán a nociceptív hőküszöb beállításához. A helyzet hasonló a patkánytalp esetében is, hiszen a TRPV1-antagonista I-RTX intraplantáris injekciója nem emelte meg a patkányok hátsó lábának nociceptív hőküszöbét (lásd feljebb). A TRPV1-nek a nociceptív hőküszöbben játszott szerepére vonatkozó további kísérleteinket lásd a 4.6. és az 5.6. pontban.

4.4. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő és az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-modell validálása patkányban

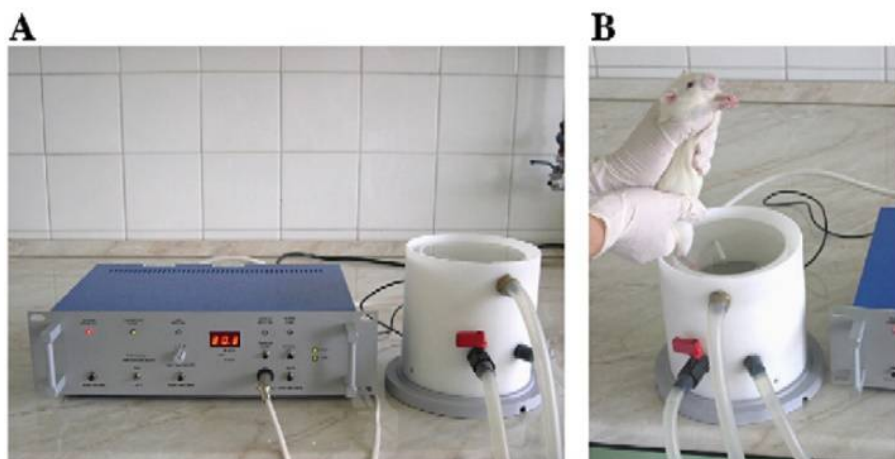
4.4.1. Előzmények és célkitűzés

Az emelkedő hőmérsékletű forró lap módszerrel nyert eredményeink igazolták, hogy a nociceptív hőküszöb mérése ígéretes megközelítés a termonocicepció vizsgálatára. Ugyanakkor a kifejlesztett készülékkel kapcsolatban sorozatos meghibásodások léptek fel, amelyek korrekciója nem sikerült kielégítő mértékben. Ezért alternatív megoldásként egy másik, szintén a nociceptív hőküszöb mérésére alkalmas készülék kifejlesztését tartottuk célravezetőnek, amelynek „őse” a korábbiakban már bevált. Amint arról fentebb említés történt, Szolcsányi János már 1985-ben végzett olyan kísérleteket (Szolcsányi, 1985; 1987b), amelyekben éber patkány egyik hátsó lábát állandó hőmérsékletű vízfürdőbe mártotta oly módon, hogy a vízfürdő hőmérsékletét 1 °C-os lépésekben növelte mindaddig, amíg az állat a lábát ki nem rántotta a vízből. Ezzel a módszerrel közelítőleg tudta mérni a nociceptív hőküszöböt. Ebből kiindulva kívántunk kifejleszteni – egy másik műszaki kooperációs partnerrel együttműködve – olyan emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt, amely alkalmas a nociceptív hőküszöb pontos meghatározására.

4.4.2. Módszerek

A nociceptív hőküszöb mérése az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel

Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt az Experimetria Kft-vel (Budapest) együttműködve fejlesztettük ki. A készülék két részből áll: egy műanyag hengerből (12 cm belső átmérő, 14 cm magasság), amelynek az alján található az elektromos fűtőegység és a vezérlőegységből, amelynek segítségével a hengerben levő víz gyorsan és viszonylag egyenletesen felmelegíthető (33. ábra). A vezérlőegység mutatja a vízfürdő aktuális hőmérsékletét, amelyet a fürdő közepén, a vízfelszín alatt 35 mm-rel mér egy termoelem. A készüléken beállítható a fűtés kiindulási hőmérséklete (30 vagy 40 °C) és sebessége (6, 12 vagy 24 °C/perc). A fűtés egy lábkapcsolóval megállítható, ilyenkor az aktuális vízhőmérséklet fixálódik a kijelzőn. A víz visszahűtése oly módon történik, hogy egy pumpa hideg vezetékes vizet szív be a vízfürdőbe, ahonnan a túlfolyó víz elvezetődik. A vízhőmérséklet egyenletességét a felfűtés során egy adott rétegben oly módon vizsgáltuk, hogy 5 termoelemet helyeztünk el 30 mm-re a középponttól egyenletesen a kerület mentén és 35 mm-rel vízfelszín alatt, és ezeket egy többcsatornás hőmérsékletmérő készülékhez (Columbus Instruments, Columbus, Ohio, USA) csatlakoztattuk.



33. ábra. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő (A panel) és a nociceptív hőküszöb mérése éber patkányban (B panel).

A mérési helyeket úgy választottuk meg, hogy nagyjából egybeessenek azokkal a pozíciókkal, ahova a patkány hátsó lába kerülhet a küszöbmérés során. Hat egymás utáni fűtési ciklus (30 °C-os kiindulási hőmérséklet és 24 °C/perc fűtési sebesség) során 4 másodpercenként mértük a vízhőmérsékletet egyidejűleg az 5 pontban. Nem találtunk szignifikáns különbséget az 5 mérési pont hőmérséklete között egy adott időpontban (kétszemponos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszttel), ami arra utal, hogy a fűtés viszonylag egyenletes hőeloszlást biztosít egy adott vízrétegben. A kiindulási (kontroll) hőküszöb méréséhez 30 °C-os kiindulási hőmérsékletet, 24 °C/perc fűtési sebességet és 53 °C „cut-off” hőmérsékletet állítottuk be. A patkányt függőleges testhelyzetben gyengéden kézbe fogva az egyik hátsó lábat kb. 3–4 cm mélyen belemártottuk a vízfürdőbe. Ezután elindítottuk a fűtést. Amikor az állat kihúzta a lábát a vízből, azonnal leállítottuk a fűtést, és a készülék által kijelzett hőmérsékletet tekintettük a láb nociceptív hőküszöbének. A küszöbmérést 30 perc múlva megismételtük ugyanazon a végtagon, és a két küszöb átlaga adta a kiindulási nociceptív hőküszöböt. A hőküszöb reprodukálhatóságát vizsgáló kísérletben mindkét hátsó végtag hőküszöbét meghatároztuk: először az egyikét, majd 10 perc múlva megismételtük ugyanazon a lábon a küszöbmérést, egészen a 60. percig. Ezt követően a másik lábon végeztük el 10 percenként a méréseket.

Az enyhe hőtrauma nociceptív hőküszöbre kifejtett hatásának, valamint e hatás farmakológiai modulációjának vizsgálata

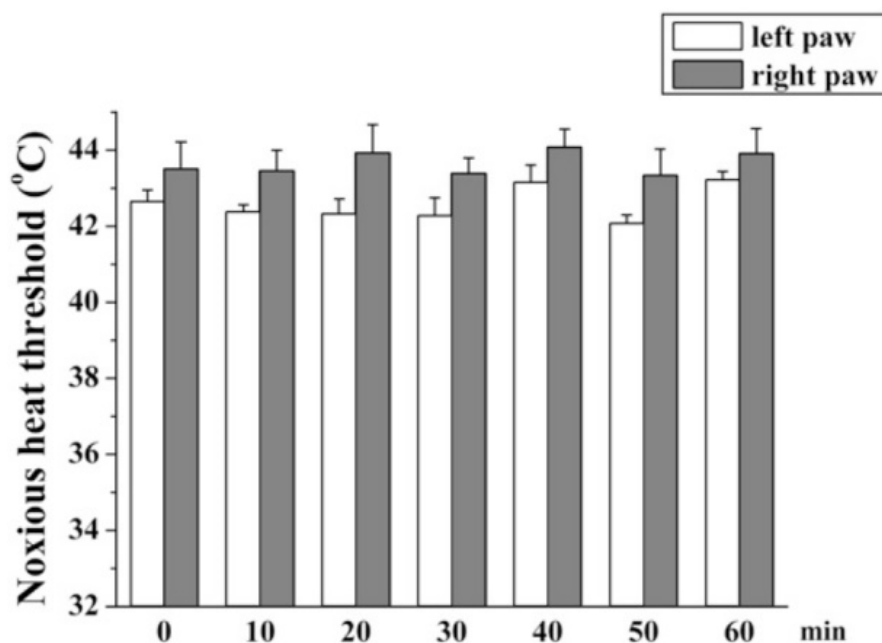
A kiindulási hőküszöb mérése után az állatokat dietiléter alkalmazásával bódítottuk, és az egyik hátsó lábat 51 °C hőmérsékletű vízbe mártottuk 20 másodpercig. Az enyhe hőtrauma ezen paramétereit előkísérletekben választottuk oly módon, hogy az állatok ébredés után nocifenzív reakciót ne mutassanak, de jelentős hőküszöbcsökkenés jöjjön létre. Az állatok felébredését

követően a hőtrauma után 0,5, 1, 1,5, 2, 4 és 24 órával történt hőküszöbmérés a termális allodynia kinetikájának vizsgálata céljából. A referencia-analgetikumok hatásának vizsgálata során a hőtrauma után 10 és 20 perccel történt hőküszöbmérés a termális allodynia verifikálása céljából (a 3 °C-nál kisebb küszöbcsökkenést mutató állatokat kizártuk a további vizsgálatból). Ezt követően a szert vagy annak szolvensét adtuk i.p. vagy intraplantárisan a 20 perces küszöbmérés után közvetlenül. Ezután a 40., 50. és 60. percben mértük a hőküszöböt (intraplantáris adás esetén már a 30. percben is).

4.4.3. Eredmények és megbeszélés

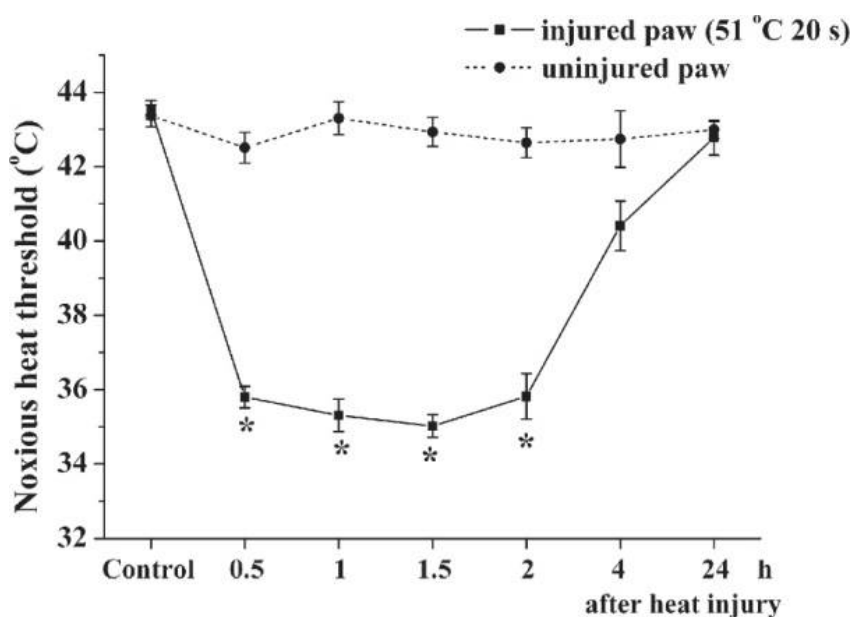
Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért nociceptív hőküszöb reprodukálhatósága és az enyhe hőtrauma hatása a nociceptív hőküszöbre

A kezeletlen patkányok hátsó lábán az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért nociceptív hőküszöb $43,5 \pm 0,4$ °C volt ($n=10$). Tízpercenként ismételt küszöbmérés során nem találtunk szignifikáns eltérést a bal vagy a jobb láb különböző időpontokban mért hőküszöbei között (**34. ábra**, egyszempontos ANOVA-t követő Newman–Keuls-teszt). Ez arra utal, hogy a nociceptív hőküszöb az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel ugyanolyan jól reprodukálható módon mérhető, mint az emelkedő hőmérsékletű forró lappal.



34. ábra. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel meghatározott nociceptív hőküszöb reprodukálhatósága ismételt mérések során ugyanazon állatsoportban ($n=8$). Az adatok átlag \pm SEM értékek. Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a bal vagy a jobb hátsó láb különböző időpontokban mért hőküszöbei között egyszempontos ANOVA utáni Newman–Keuls-tesztel vizsgálva.

A hőtrauma (51 °C, 20 s) után az állatok néhány percen belül felébredtek az éternarkózisból. Ezt követően nocifenzív reakció nem volt megfigyelhető. A hőtrauma után fél órával 7–8 °C-kal lecsökkent a hőküszöb, és ez a termális allodynaiaként értékelhető hatás a 2. óra végéig közel állandó mértékben fennállt (35. ábra). 24 órával a hőtrauma után a hőküszöb visszatért a kiindulási értékre. Az éternarkózis önmagában nem befolyásolta a nociceptív hőküszöböt, mivel a hőtraumának ki nem tett láb hőküszöbe nem mutatott semmiféle változást.



35. ábra. Enyhe hőtrauma (51 °C-os vízbe mártás 20 másodpercig) hatása a hátsó láb nociceptív hőküszöbére. Az adatok átlag±SEM értékek (n=12). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jeleznek a kiindulási kontroll értékhez képest ($p < 0,05$, egyszempontos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt).

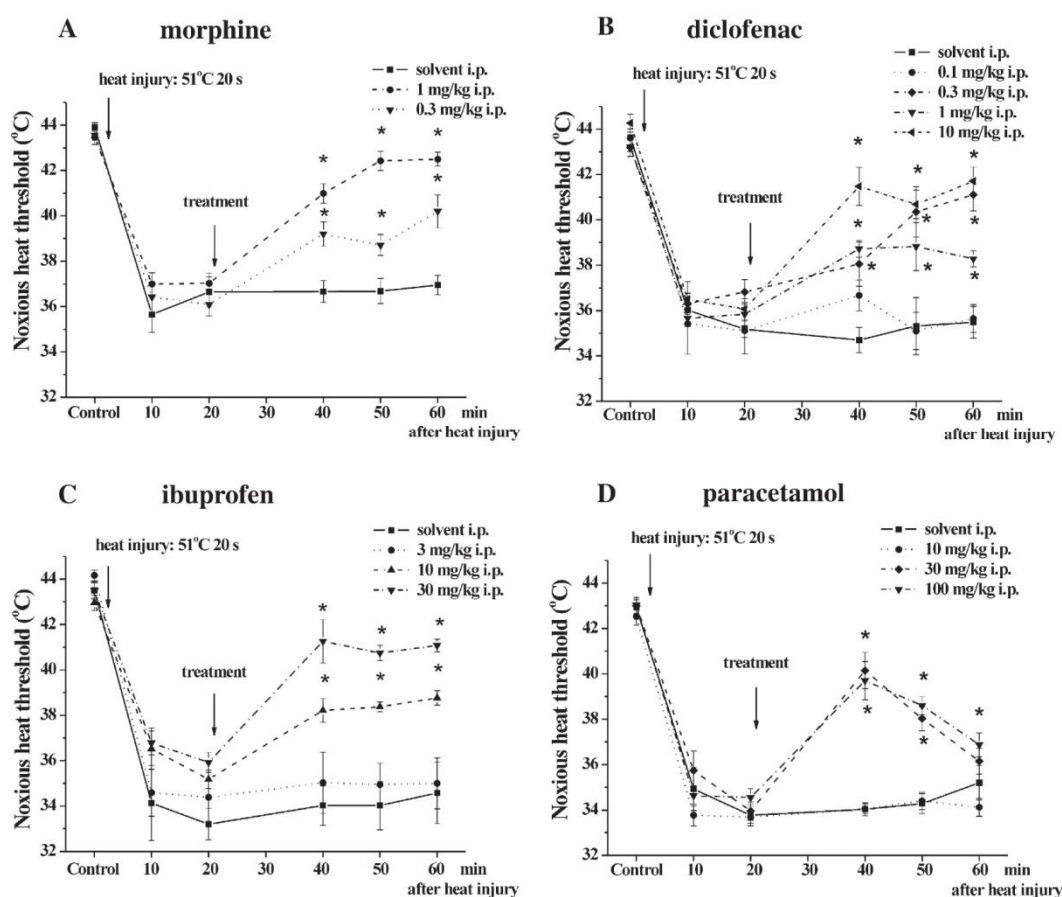
Bár emberben pszichofizikai és elektrofiziológiai vizsgálatokban már kimutatták a termális fájdalomküszöb csökkenését hőtrauma hatására (Meyer és Campbell, 1981, LaMotte *et al.*, 1982), illetve állatkísérletekben latenciamérési módszerekkel detektálták a hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziát (Coderre és Melzack, 1987; Nozaki-Taguchi és Yaksh, 1998), a jelen munka az első dokumentált kísérlet, amelyik a hőtrauma hőküszöbcsökkentő hatását éber állatban kimutatta. Az általunk patkányban mért, hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenés mértéke és kinetikája hasonló, mint a korábbi humán vizsgálatokban tapasztalt (Meyer és Campbell, 1981, LaMotte *et al.*, 1982).

Kiemelendő, hogy a jelentős mértékű hőküszöbcsökkenés nocifenzív reakció nélkül alakult ki. A kísérleteinkben kimutatott hőküszöbcsökkenést termális allodynaiaként értékelhetjük, amelynek kinetikája hasonló, mint a latenciamérési állatkísérletekben kimutatott, szintén hőtraumával kiváltott termális hiperalgéziáé (Coderre és Melzack, 1987; Nozaki-Taguchi és Yaksh, 1998). Ugyanakkor eltérés, hogy Coderre és Melzack (1987) kísérleteiben az

ellenoldali lábon is kialakult hiperalgémia, nálunk viszont csak a hőtraumának kitett lábon volt küszöbcsökkenés, ami talán azzal magyarázható, hogy mi enyhébb hőtraumát alkalmaztunk. Az enyhe hőtraumával kiváltott termális allodynia a klinikailag releváns elsőfokú égési sérülés állatkísérletes modelljének tekinthető, emiatt transzlációs szempontból is jelentős.

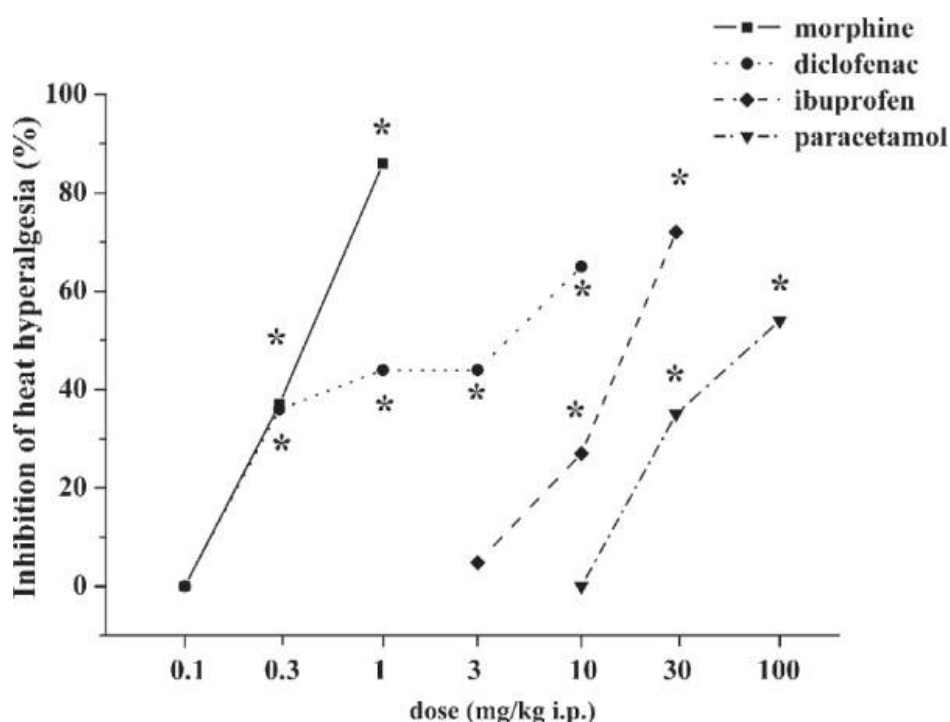
Referencia-analgetikumok hatása az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenésre

A szisztémásan adott morfin, diclofenac, ibuprofen és paracetamol egyaránt gátolta az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenést (36. ábra). A 40., 50. és 60. percben mért hőküszöbcsökkenés összege alapján számított százalékos gátlások (lásd 4.2. pont) felhasználásával nyert dózis–hatás görbéket a 37. ábra mutatja. A morfin legnagyobb dózisa közel teljes gátlást okozott, de a másik három szernél is 50% fölött volt a maximális gátlás. A morfin, ibuprofen és a paracetamol esetében a gátlás dóziszfüggőnek mutatkozott, ellenben a diclofenacnál ez nem volt egyértelmű.



36. ábra. Szisztémásan adott morfin (A panel), diclofenac (B panel), ibuprofen (C panel) és paracetamol (D panel) hatása az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenésre. A szereket a hőtrauma utáni 20. percben történt hőküszöbmérést követően adtuk. i.p. Az adatok átlag±SEM értékek (n=8–12). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jeleznek a megfelelő szolvenssel kezelt csoporthoz képest (p<0,05, kétszemponos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt).

A diclofenac laposabb dózis–hatás görbéjének hátterében farmakokinetikai (pl. eltérő mértékű és ütemű szöveti akkumuláció) vagy farmakodinámiai eltérés állhat. Kimutatták, hogy a diclofenac az indometacinnal ellentétben képes aktiválni az NO–cGMP–K⁺-csatorna tengelyt (Tonussi és Ferreira, 1994; Ortiz *et al.*, 2003), jelezve, hogy antinociceptív hatása nemcsak COX-gátlást foglalhat magába. Tehát az egyes NSAID-ok farmakodinámiailag nem teljesen „csereszabatosak”, ami magyarázhatja a diclofenac eltérő viselkedését. A szerek minimális hatékony dózisát és ED₅₀ értékét az **5. táblázat** tartalmazza. Figyelemreméltó, hogy ezek az értékek mindegyik szernél igen alacsonyak, jelezve a paradigma nagy érzékenységet mind az ópioid, mind a nem-ópioid típusú standard analgetikumok iránt. Mind a négy szer ED₅₀ értéke alacsonyabb vagy ugyanakkora, mint a latenciamérésen alapuló tesztekkel („tail-flick”, plantárteszt) vizsgált különböző hiperalgésia-modellekben kapott ED₅₀ értékek (Gelgor *et al.*, 1992; Bianchi és Panerai, 1996; Dirig *et al.*, 1998; Berg *et al.*, 2000; Hamura *et al.*, 2000; Sluka, 2000).



37. ábra. Dózis–hatás összefüggés az analgetikumok enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenésre kifejtett gátló hatására vonatkozóan. A hőküszöbcsökkenés százalékos gátlását a 40., 50. és 60. percben mért hőküszöbcsökkenések összegének átlagán számoltuk. A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jeleznek a megfelelő szolvenssel kezelt csoporthoz képest ($p < 0,05$, kétszemponos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt).

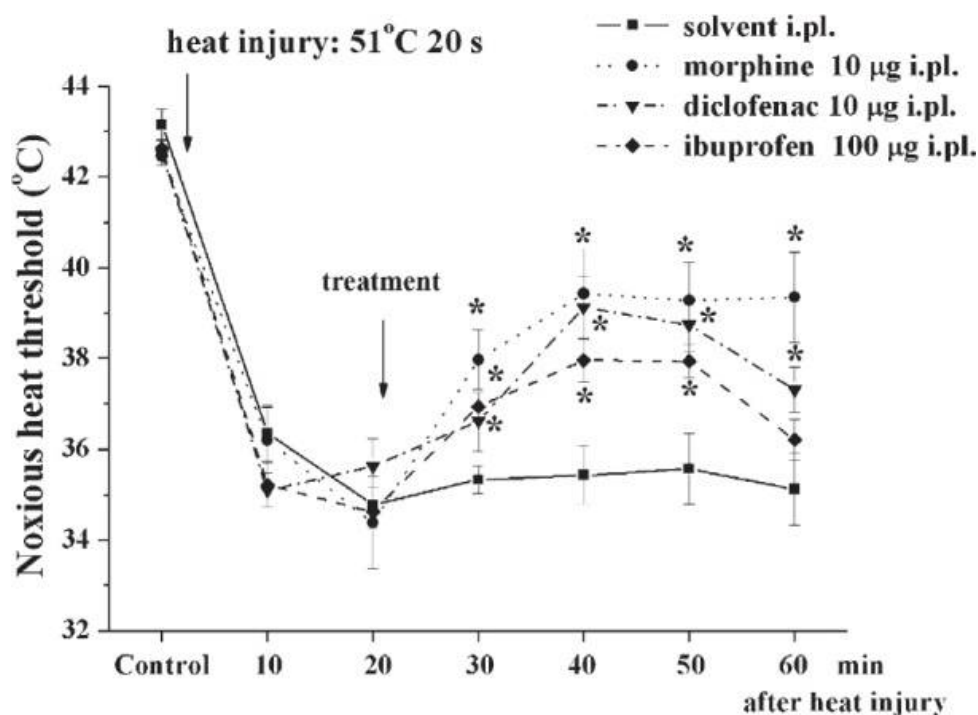
5. táblázat. A morfin, diclofenac, ibuprofen és paracetamol legkisebb hatékony dózisa (MED) és ED₅₀ értéke az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenésre kifejtett gátló hatásra vonatkozóan.

	MED (mg/kg i.p.)	ED ₅₀ (mg/kg i.p.)
Morphine	0.3	0.5
Diclofenac	0.3	3
Ibuprofen	10	18
Paracetamol	30	100

A MED az a legalacsonyabb vizsgált dózis, amelyik szignifikánsan gátolta a hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenést a szolvenséhez képest. Az ED₅₀ értéket interpolációval határoztuk meg a 37. ábra alapján mint azt a dózist, amelyik felére csökkentette a hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenést.

Az is hangsúlyozandó, hogy a hőtrauma után, de az analgetikum adása előtt is történt hőküszöbmérés, ami lehetővé tette az allodynia kialakulásának a verifikálását, és ezáltal azt, hogy csak olyan állat kapjon analgetikumot (vagy szolvenst), amelyikben kialakult a küszöbcsökkenés. Paradigmánk utánozta a klinikai gyakorlatot abban az értelemben is, hogy az analgetikum adása az allodynia kialakulása után, és nem előkezelés formájában történt. Ennek megfelelően a szerek hatásának vizsgálata a hőtraumától számított 40–60 perces intervallumban történt, amikor már számottevő gyulladásos reakció alakulhatott ki. Emiatt nem zárható ki, hogy a diclofenac és az ibuprofen esetében a mért anti-allodynias hatás egy része a szerek gyulladásgátló hatásának másodlagos következményeként jött létre.

Az intraplantárisan adott morfin, diclofenac és ibuprofen szintén gátolta a hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenést olyan dózisokban, amelyek alacsonyabbak, mint a szisztémás adásnál meghatározott minimálisan hatékony adagok, jelezve a szerek lokális hatását (**38. ábra**). Ezzel összhangban mind a morfin, mind a COX-gátló szerek perifériás támadáspontjára vonatkozó támogató adatok ismertek (Ferreira *et al.*, 1978; Levine és Taiwo, 1989; Stein *et al.*, 1988; Stein, 1995). Szintén megemlítendő, hogy a hőtraumával kiváltott hiperalgézát gátolta a perifériásan ható ópioid loperamid (Nozaki-Taguchi és Yaksh, 2002). Az ópioidok perifériás analgetikus hatása a nociceptorokon – nagyobb számban gyulladás hatására – expresszáldó ópioidreceptorok aktiválása révén jön létre, míg a COX-gátlók csökkentik a perifériás nociceptor-szenzibilizáló hatással bíró prosztaglandinok (PGE₂, PGI₂) szintézisét.



38. ábra. A lokálisan adott morfin, diclofenac és ibuprofen hatása az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenésre. A szereket a hőtrauma utáni 20. percben történt hőküszöbmérést követően adtuk intraplantárisan (i.pl.). Az adatok átlag±SEM értékek (n=8–12). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jeleznek a megfelelő szolvenssel kezelt csoporthoz képest ($p < 0,05$, kétszemponos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt).

Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő összehasonlítása az emelkedő hőmérsékletű forró lappal

Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő esetében a patkányt kézben kell tartani, kb. 30–35 másodpercig, ellenben az emelkedő hőmérsékletű forró lapon az állatok szabadon mozognak. A vízfürdőben a bemártott láb teljes felületét éri a hőinger, míg a forró lapon csak a talpi részt, viszont mind a négy végtagét. A vízfürdőben fellépő nocifenzív reakció (a láb kirántása) spinális reflex eredménye, ellenben a forró lapon tapasztalt nyalása, rázása a végtagnak szupraspinálisan integrálódó reakció. Közös jellemzője mindkét készüléknek a nociceptív hőküszöb mérésének kiváló reprodukálhatósága.

4.5. A sebészi bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-modell validálása patkányban

4.5.1. Előzmények és célkitűzés

A patkányban vagy egerben a hátsó láb talpi részén sebészi bemetszéssel (plantáris incízióval) keltett termális és mechanikai hiperalgéria a posztoperatív fájdalom elfogadott állatkísérletes modellje (Brennan *et al.*, 1996; Zahn és Brennan, 1999; Pogatzki és Raja, 2003). A tartós, kb. 1 hétig fennálló hiperalgéria mechanizmusa összetett, és eltéréseket mutat a tisztán gyulladásos modellekhez képest (Zahn *et al.*, 2002; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2005). Ennek hátterében – egyebek mellett – az állhat, hogy az incízióval nemcsak szöveti trauma alakul ki, hanem az apró idegágak átvágásával a hiperalgériának neuropátiás komponense is kialakul. Korábbi – az emelkedő hőmérsékletű forró lappal, illetve vízfürdővel végzett – kísérleteinkben két akut modellben tudtuk kimutatni a nociceptív hőküszöb csökkenését: RTX hatására kb. fél óráig, az enyhe hőtrauma esetében 2 óráig tartott a küszöbcsökkenés (lásd 4.3.3. és 4.4.3. pont). Mindezek fényében kíváncsiak voltunk annak vizsgálatára, hogy kimutatható-e a nociceptív hőküszöb csökkenése a sebészi bemetszéssel kiváltott szubakut/krónikus hiperalgéria során. Pozitív eredményben reménykedve az is célunk volt, hogy megvizsgáljuk a hőküszöbcsökkenés farmakológiai modulációját opioid és nem-opioid analgetikumok hatásainak vizsgálatával.

4.5.2. Módszerek

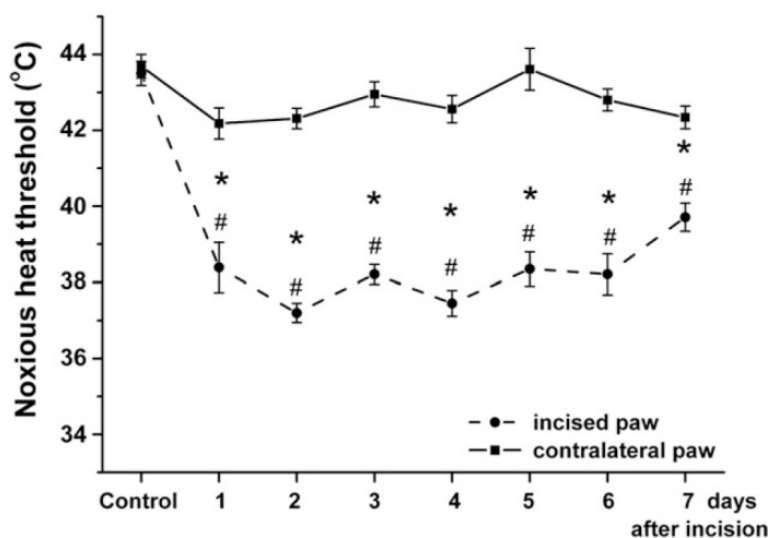
A plantáris incízió nociceptív hőküszöbre kifejtett hatásának és e hatás farmakológiai modulációjának vizsgálata

A kiindulási (preoperatív) nociceptív hőküszöb emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel történő mérése (lásd 4.4.2. pont) után a patkányok bal hátsó lábán plantáris incíziót végeztünk Brennan és munkatársai (1996) módszere szerint, kis módosításokkal. Az állatokat 50 mg/kg s.c. adott pentobarbitállal (CEVA Inc.) elaltattuk, majd a bal hátsó láb talpi részén steril előkészítés után a sarok proximális élétől 1 cm-re kezdve 10-es pengével hosszanti irányban az ujjak felé bemetszést ejtettünk, átvágva a bőrt, fasciát és a plantáris izomzatot. A sebet két varrattal zártuk, majd povidon-jód-oldattal (Betadine, Egis, Budapest) bekentük. Az állatok 18 óráig tartó periódus során tértek magukhoz. Ébredés után a posztoperatív hőküszöb mérésére került sor, majd az egyik szériában kezelésben nem részesülő állatok incindált lábának hőküszöbét mértük naponta, egy héten át. Egy másik sorozatban a legalább 3 °C-os küszöbcsökkenést mutató állatokban – aktuális szolvenskontroll (lásd 4.2. pont) mellett – morfin, diclofenac vagy

paracetamol i.p. vagy intraplantáris adására került sor, és ezután a 20., 30, és 40. percben történt hőküszöbmérés (intraplantáris adás esetén a 10. percben is).

4.5.3. Eredmények és megbeszélés

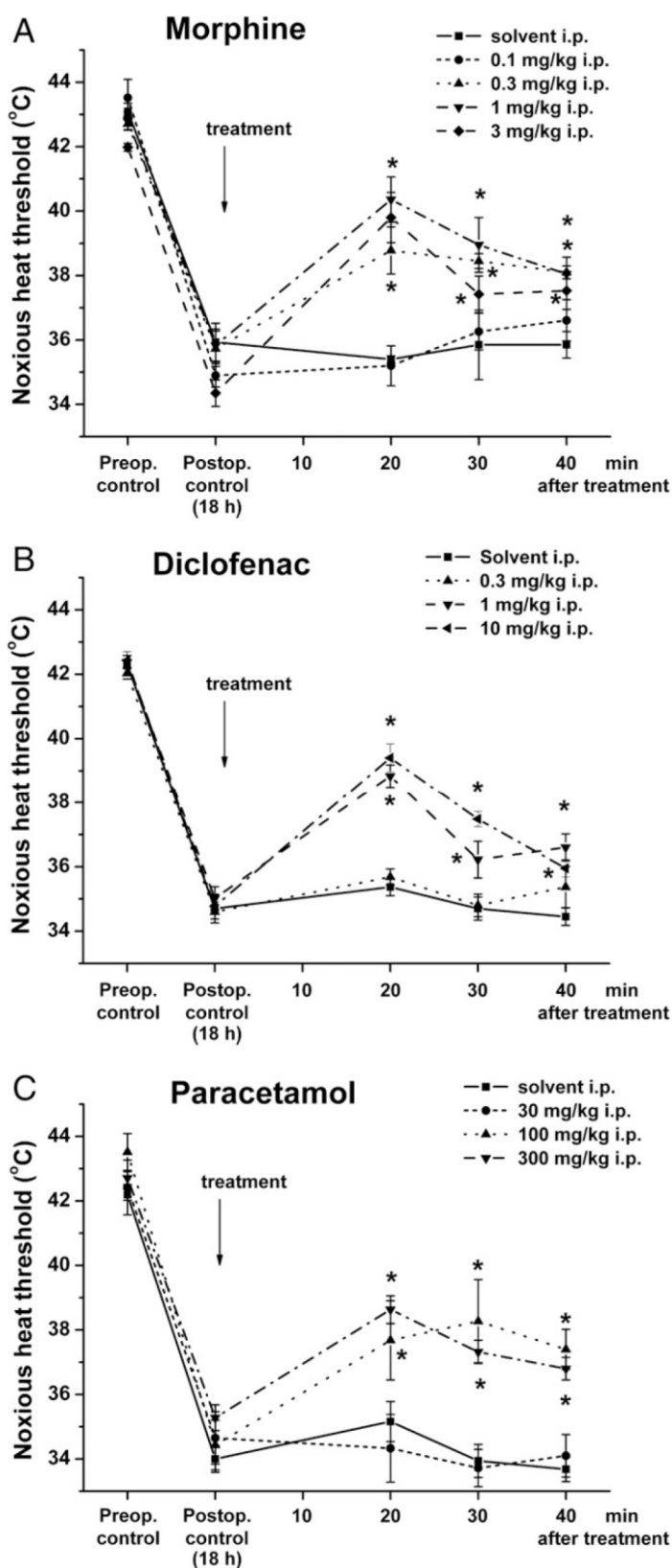
A patkányok preoperatív kontroll hőküszöbe $43,7 \pm 0,4$ °C volt ($n=16$). 18 órával a sebészi bemetszés után a narkózisból magukhoz tért állatok nem mutattak semmiféle nocifenzív reakciót, lehetővé téve a nociceptív hőküszöb meghatározását. Az általános érzéstelenítés nem váltott ki olyan utóhatást, amely befolyásolta volna a hőküszöböt, hiszen az ellenoldali, nem incindált láb küszöbe nem változott meg szignifikánsan a preoperatív kontrollhoz képest (**39. ábra**). Ez utóbbi eredmény egyben a nociceptív hőküszöb naponkénti mérésének jó reprodukálhatóságát is jelzi. Az ismételt küszöbmérések során kiderült, hogy az incízió hatására 5–7 °C-os hőküszöbcsökkenés, azaz termális allodynia jött létre, amely nagyjából változatlan mértékben legalább 7 napon keresztül fennállt (**39. ábra**). Ez a kinetika hasonló, mint a latenciaméréssel kimutatott, incízió-indukálta termális hiperalgéziáé (Zahn és Brennan, 1999), jelezve, hogy a hőküszöbmérés ugyanúgy alkalmas a jelenség vizsgálatára, mint a konvencionális megközelítés. Eredményeink azt is jelzik, hogy a nociceptív hőküszöb csökkenése nemcsak akut modellekben, rövid távon mutatható ki (RTX, P2X-receptor-aktiváció, enyhe hőtrauma, OLDA, 3-MOLDA hatására; lásd 4.3.3., 4.4.3., 5.3.2. pont), hanem szubakut/krónikus paradigmában is. Az incíziómodellben latenciaméréssel csak elsődleges termális hiperalgéziát tudtak kimutatni, másodlagosat nem (Zahn és Brennan, 1999), ami azt



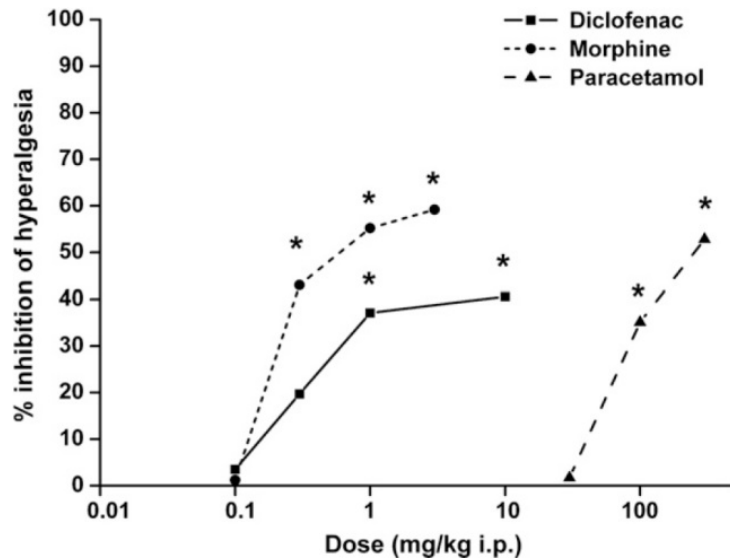
39. ábra. Patkány hátsó lábának talpán ejtett sebészi bemetszés hatása a nociceptív hőküszöbre. Az adatok átlag \pm SEM értékek ($n=12$). A szimbólumok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jeleznek ($p<0,05$, kétszemponos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt). Kettős kereszt: szignifikáns eltérés a bemetszett lábon a kiindulási, preoperatív kontroll értékhez képest; csillag: szignifikáns eltérés az ellenoldali, kezeletlen lábhoz viszonyítva.

jelenti, hogy a latenciarövidülés csak az incízió területén volt kimutatható, ép részen nem. Ez arra utal, hogy a fokozott válaszkészség a perifériás nociceptorok szenzibilizálódásának a következménye (Meyer és Campbell, 1981; LaMotte *et al.*, 1982). Valóban, *in vitro* elektrofiziológiai kísérletekben patkány hátsó végtagjának bőrében incízió hatására a polimodális C nociceptorokban spontán aktivitást és termális aktivációs küszöb csökkenését mutatták ki (Banik és Brennan, 2004). Mindez jó példát szolgáltat a hőküszöbmérés azon előnyére, hogy segítségével a magatartási és az elektrofiziológiai eredmények közvetlenül összevethetők.

A következő sorozatban referencia-analgetikumok antiallodyniás hatását vizsgáltuk. Lényeges momentum, hogy az analgetikumok adása az incízió okozta allodynia kialakulása után, az első posztoperatív hőküszöbmérést követően történt. Ez egyrészt lehetővé tette, hogy csak azon állatok részesüljenek kezelésben, amelyekben számottevő mértékű hőküszöbcsökkenés alakult ki, másrészt az eljárás utánozta a klinikai gyakorlatot, ahol az analgetikumot többnyire a fájdalomállapot fellépése után adják. Az első posztoperatív hőküszöbmérést (18 órával az incízió után) követően szisztemásan adott morfin, diclofenac és paracetamol egyaránt dózisfüggő módon csökkentette az incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenést a szolvenséhez viszonyítva, azaz antiallodyniás hatást fejtett ki (**40. ábra**). Az e hatásra vonatkozó dózis–hatás görbéket a **41. ábra** mutatja: az allodynia százalékos gátlását a 20., 30. és 40. percben mért hőküszöbcsökkenések összege alapján számítottuk a 4.2. pontban említett képlet segítségével. A morfin gátló hatása volt a legmagasabb, 60% körüli, a paracetamol valamivel kisebb (55%-os) maximális hatást váltott ki, mint a morfin, de csak nagyobb dózisokban. A diclofenac maximális gátló hatása 40% körül volt. A morfinnak a hőküszöbcsökkenés gátlására vonatkozó 0,3 mg/kg-os minimális hatékony dózisa kisebb vagy ugyanakkora, mint amit a latenciamérési plantártesztben találtak (Field *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2008), jelezve hogy az incíziós modellben a hőküszöbmérés érzékenysége az ópoidok iránt legalább akkora, mint a latenciamérése. A diclofenac minimális hatékony dózisa a jelen kísérletekben 1 mg/kg volt; mindössze egy vizsgálatban mérték e szer termális antihyperalgeziás hatását a plantárteszttel incízióban, amelyben csak az egyedül vizsgált 5 mg/kg-os dózis hatékonyságáról számoltak be (Biddlestone *et al.*, 2007). Tudomásunk szerint a paracetamol hatását latenciamérési módszerrel nem vizsgálták incízióban. Mindhárom vizsgált analgetikum esetében az incízió okozta hőküszöbcsökkenés gátlására vonatkozó minimális hatékony dózis hasonló volt, mint a korábbi kísérleteinkben RTX-szel vagy az enyhe hőtraumával indukált küszöbcsökkenésre nézve (lásd 4.3.3. és 4.4.3. pont).

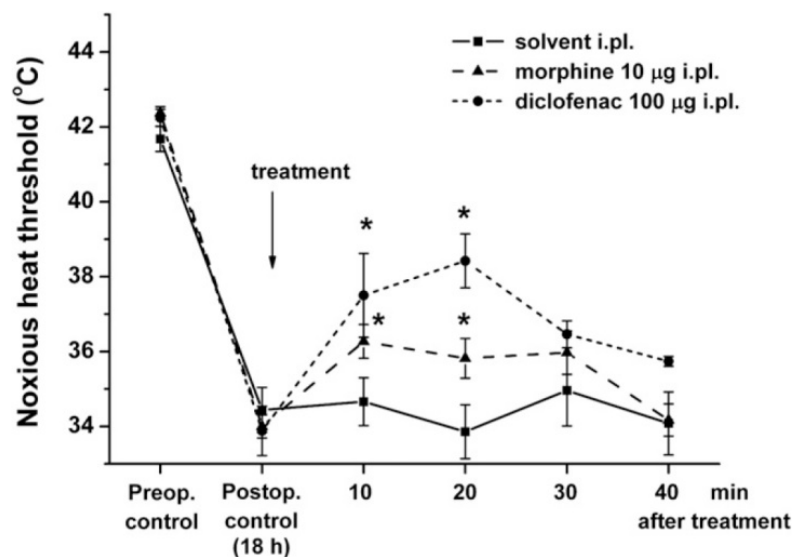


40. ábra. Szisztémásan adott morfin (A panel), diclofenac (B panel) és paracetamol (C panel) hatása a plantáris incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenésre. A preoperatív kontroll az incízió előtt, a posztoperatív kontroll az az után 18 órával mért nociceptív hőküszöböt jelenti. A szolvenssel történt kezelés abban a sorozatban alkalmazott vehikulumra vonatkozik, amelyben a szer legmagasabb dózisának hatását vizsgáltuk. A magasabb dózisok hatását is aktuális szolvens-kontrollok használatával végeztük, ezeket azonban nem mutatjuk. A szereket a posztoperatív kontroll küszöbmérés után adtuk i.p. Az adatok átlag \pm SEM értékek ($n=8-12$). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jeleznek a megfelelő szolvenssel kezelt csoporthoz képest ($p<0,05$, kétszemponos ANOVA utáni Newman-Keuls-teszt).



41. ábra. Dózis-hatás összefüggés a morfin, diclofenac és paracetamol plantáris incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenésre kifejtett gátló hatására vonatkozóan. A százalékos gátlást a 20., 30. és 40. percben mért hőküszöbcsökkenések összegének átlaga alapján számoltuk ($n=10-12$). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jeleznek a megfelelő szolvenssel kezelt csoporthoz képest ($p<0,05$, kétszemponos ANOVA utáni Newman-Keuls-teszt).

Az intraplantárisan adott morfin és diclofenac egyaránt csökkentette az incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenést a szolvenséhez viszonyítva (**42. ábra**), hasonlóan az enyhe hőtraumához (lásd 4.4.3. pont). Az i.pl. adott dózisok kisebbek, mint a szisztémás adásnál meghatározott minimálisan hatékony adagok, jelezve a szerek lokális hatását. Amint arról a 4.4.3. pontban már említés történt, mind a morfin, mind a COX-gátló szerek perifériás támadáspontjára vonatkozó adatok ismertek. Megjegyzendő, hogy az intrapalantáris adás is a termális allodynia kifejlődése után történt, utánozva a klinikai gyakorlatot.



42. ábra. A lokálisan adott morfin és diclofenac hatása a plantáris incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenésre. A preoperatív kontroll az incízió előtt, a posztoperatív kontroll az az után 18 órával mért nociceptív hőküszöböt jelenti. A szereket a posztoperatív kontroll küszöbmérés után adtuk intraplantárisan (i.pl.). Az adatok átlag \pm SEM értékek ($n=8-12$). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jeleznek a megfelelő szolvenssel kezelt csoporthoz képest ($p<0,05$, kétszemponos ANOVA utáni Newman-Keuls-teszt).

4.6. TRPV1-receptor-antagonisták összehasonlító vizsgálata patkányban a nociceptív hőküszöb csökkenésén alapuló hőallodynia-modellekben

4.6.1. Előzmények és célkitűzés

Kísérleteink idejében az SB705498 (Rami *et al.*, 2006), a BCTC (Valenzano *et al.*, 2003; Pomonis *et al.*, 2003) és az AMG9810 (Gavva *et al.*, 2005) az érdeklődés homlokterében álló, szelektív TRPV1-antagonisták voltak. Az általunk kifejlesztett, a patkány hátsó lábán mért nociceptív hőküszöb csökkenésén alapuló három hőallodynia-modell közül az elsőben a TRPV1-receptor-agonista RTX-szel váltjuk ki a hőküszöb csökkenését, így e receptor szerepe nyilvánvaló, de kísérletesen is bizonyított (lásd 4.3.3. pont). Az enyhe hőtraumával, illetve a plantáris bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenésben korábbi vizsgálatainkban igazoltuk a TRPV1 közvetítő szerepét (lásd 5.2.2. pont). Mindezek lehetővé tették, hogy a fent említett – három különböző gyár által előállított – TRPV1-antagonista hatásait direkt módon összehasonlítsuk az általunk kifejlesztett, a nociceptív hőküszöb csökkenésén alapuló hőallodynia-modellekben. Ezenkívül az RTX-modell felhasználásával össze akartuk hasonlítani a hőküszöbmérésen és a hagyományos, latenciaidő-mérésen alapuló metodikai megközelítés TRPV1-antagonisták iránti érzékenységet.

4.6.2. Módszerek

Az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenés vizsgálata

A módszer leírása a 4.3.2. pontban található. Ehhez képest annyi volt az eltérés, hogy a nociceptív hőküszöböt az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mértük, és az RTX intraplantáris dózisa 0,01 µg volt. Mindhárom TRPV1-antagonistát per os (0,5 ml/100 g) adtuk 1 órával az RTX injekciója előtt.

Az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenés vizsgálata

A módszer leírása a 4.4.2. pontban található. Ehhez képest csak annyi volt az eltérés, hogy a patkányokat halothannal altattuk. Ebben a modellben mindhárom TRPV1-antagonistát i.p. adtuk, mert a validált protokoll szerint a szer adása és az első hőküszöbmérés között csak 20 perc telt el.

A plantáris bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenés vizsgálata

A módszer leírása a 4.5.2. pontban található. Ehhez képest annyi eltérés volt, hogy a per os (0,5 ml/100 g) történő antagonistaadás után 1, 2, 3 és 4 órával történt hőküszöbmérés.

A TRPV1-antagonisták alap hőküszöbre kifejtett hatásának vizsgálata

A kiindulási hőküszöb meghatározása után i.p. 30 mg/kg-os dózisban adtuk a TRPV1-antagonistát vagy annak szolvensét, majd a 30. illetve a 60. percben mértük a hőküszöböt.

Az RTX latenciaidőre kifejtett hatásának vizsgálata a Hargreaves-féle plantártesztben

Ebben a sorozatban az RTX-szel kiváltott termális hiperalgéziát „Plantar Test Type 7371” készülék (Ugo Basile, Comerio, Italy) segítségével mért latenciaidő alapján vizsgáltuk Hargreaves és munkatársai (1988) módszerével. A sugárzó hő intenzitását 85%-ra állítottuk be. A patkányt egy műanyagdoboz üvegből készült aljára helyeztük, és a hőingerként szolgáló fénysugarat az egyik hátsó végtag plantáris felszínére irányítottuk. Amint az állat elrántotta a lábát, a hőstimuláció automatikusan leállt, és a stimuláció elejétől eltelt időt kijelezte a készülék, mint latenciaidőt. Két kontrollmérés után – amelyek átlaga szolgáltatta a kiindulási latenciaidőt – a megfelelő TRPV1-antagonistát per os (0,5 ml/100 g) adtuk, majd 1 óra elteltével RTX-et (0,06 µg) adtunk intraplantárisan, és 10 perc múlva megismételtük a latenciaidő mérését.

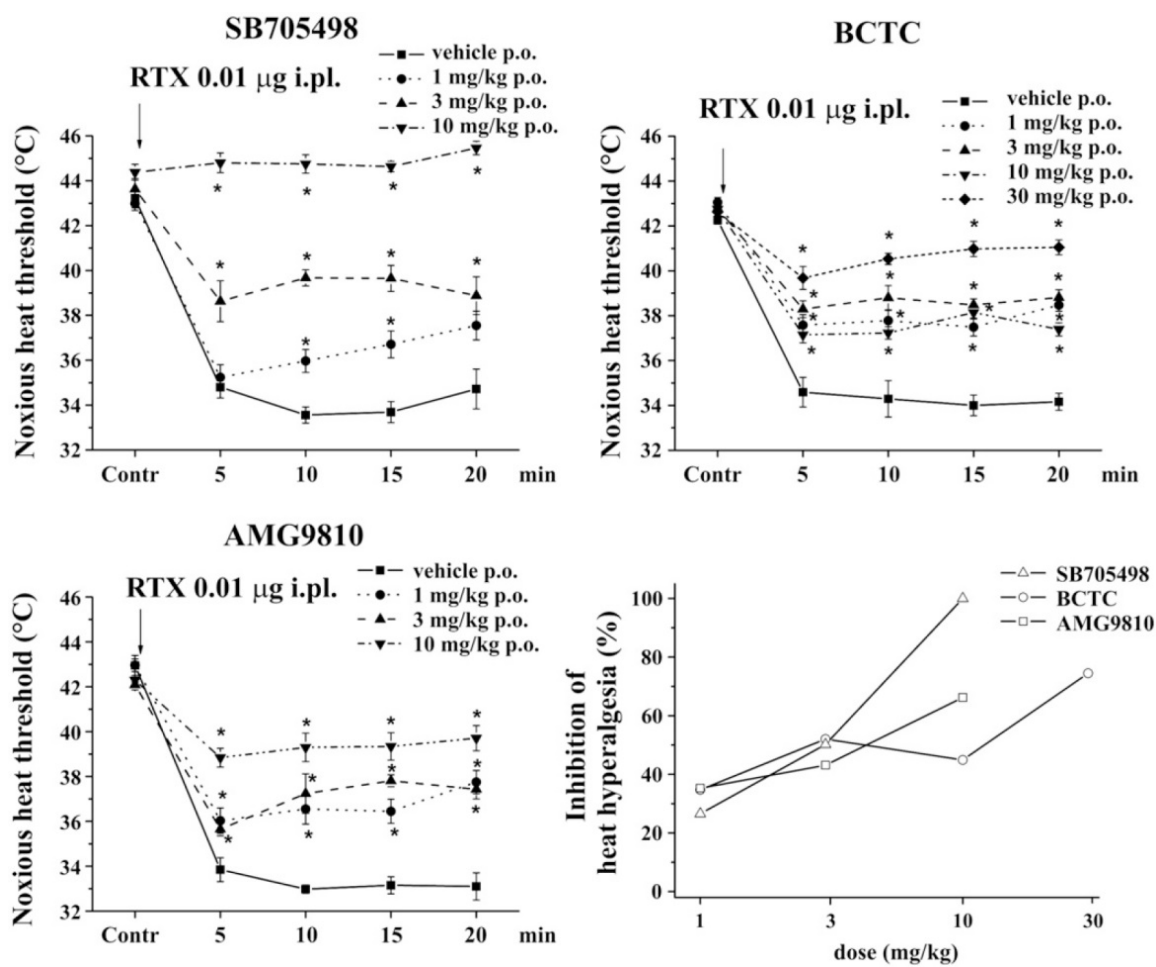
Az adatok analízise

Mindig aktuális szolvenskontrollt használtunk (lásd 4.2. pont). A TRPV1-antagonisták hőküszöbcsökkenést gátló hatását százalékban adtuk meg a szokásos képlet (lásd 4.2. pont) segítségével a különböző időpontokban mért hőküszöbcsökkenések összegére vonatkozóan. A plantártesztben meghatározott latenciaidők esetében az alábbi képletet használtuk: $(LR_{szolv} - LR_{szer}) / LR_{szolv} \times 100$, ahol LR_{szolv} és LR_{szer} a szolvenssel, illetve a szerrel kezelt csoportban mért latenciaidő-rövidülések átlagát jelentik.

4.6.3. Eredmények

A TRPV1-antagonisták hatása az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenésre

Az RTX intraplantáris injekciója az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért nociceptív hőküszöböt is drasztikusan, mintegy 8–10 °C-kal lecsökkentette, és ez a küszöbcsökkenés legalább 20 percig fennállt (**43. ábra**). Mindhárom TRPV1-antagonista p.o. előkezelést követően dózisfüggő módon gátolta az RTX-szel kiváltott termális allodyníát minden mérési időpontban. Mindhárom szer minimális hatékony dózisa 1 mg/kg volt (**6. táblázat**). Az SB705498 legmagasabb dózisa teljesen megszüntette a hőküszöbcsökkenést, míg a BCTC és az AMG9810 maximális gátló hatása 74,5, illetve 66,2%-os volt (**43. ábra**).



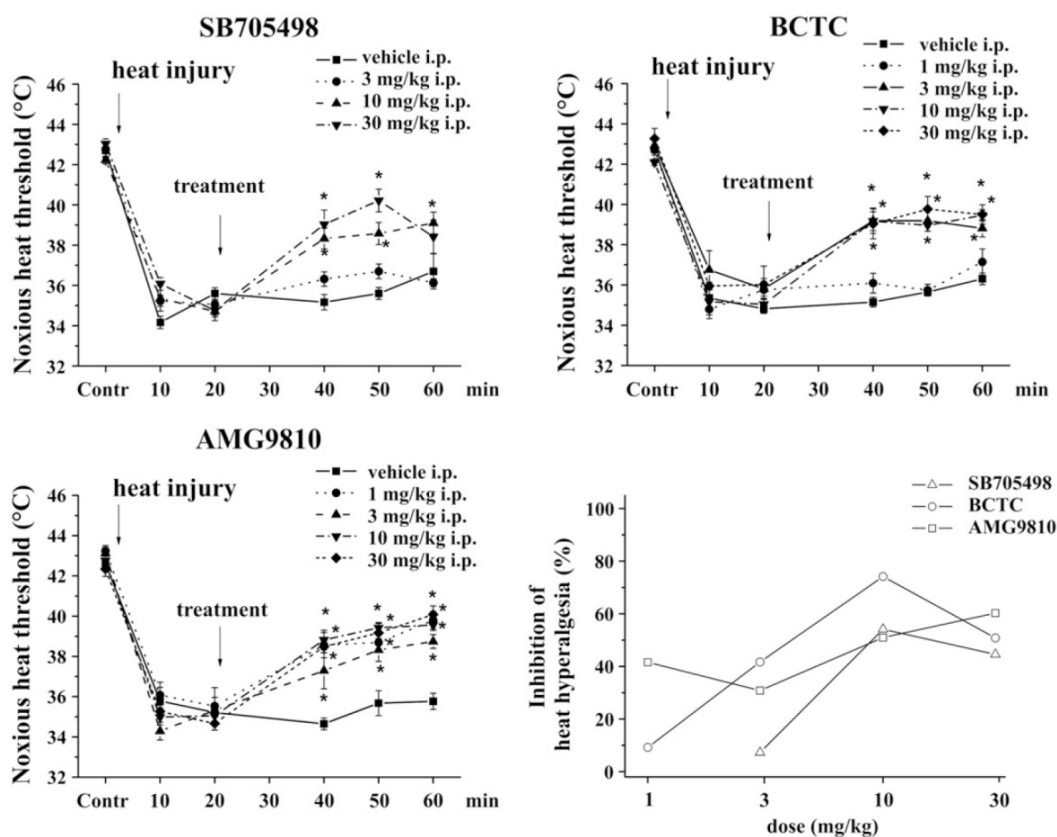
43. ábra. TRPV1-antagonista szerekkel történő 1 órás p.o. előkezelés hatása az intraplantárisan (i.pl.) adott RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenésre. Az adatok átlag \pm SEM értékek ($n=6-12$ csoportonként). A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p<0,05$) eltérő értéket jelölnek a szolvenssel történt előkezeléshez viszonyítva (Student-féle kétmintás t-próba). A jobb oldali alsó panel a hőküszöbcsökkenés gátlására vonatkozó dózis-hatás összefüggést mutatja.

A TRPV1-antagonisták hatása az enyhe hőtraumával kiváltott hőküszöbcsökkenésre

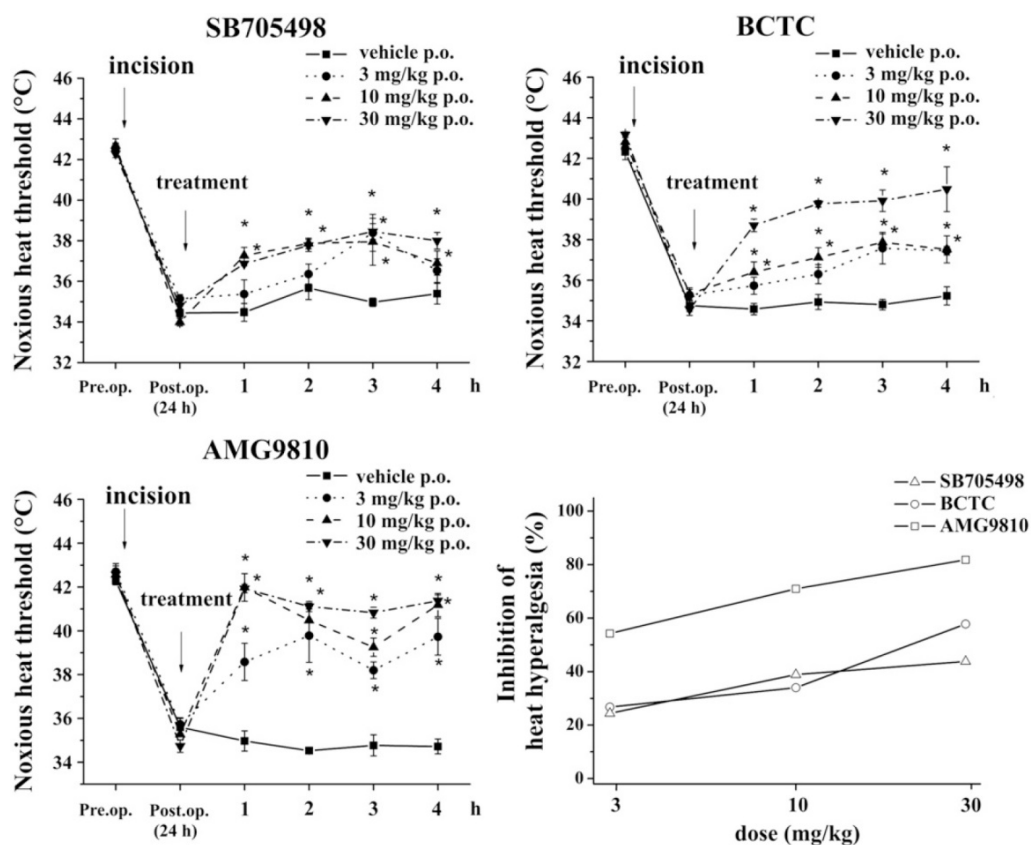
Mindhárom TRPV1-antagonista i.p., a hőtrauma után adva dózisfüggő módon gátolta az enyhe égési sérüléssel kiváltott hőküszöbcsökkenést (**44. ábra**). A vizsgált 1–30 mg/kg-os dózistartományban a leghatékonyabb szer a BCTC volt 74,2%-os gátlással, a legkevésbé aktív az SB705498 volt 54,1%-os gátlással. Az AMG9810 minimális hatékony dózisa volt a legalacsonyabb, míg az SB705498-é a legmagasabb **6. táblázat**).

A TRPV1-antagonisták hatása a plantáris bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenésre

Mindhárom TRPV1-antagonista p.o. alkalmazása – az incízióval keltett termális allodynia verifikálása után – dózisfüggő módon gátolta a bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenést (**45. ábra**). A legnagyobb hatékonyságot az AMG9810 mutatta 84,4%-os gátlással, a legkevésbé aktív az SB705498 volt 40,5%-kal. A minimális hatékony dózis alapján az AMG9810 és a BCTC voltak a legpotensebbek (**6. táblázat**).



44–45. ábra. TRPV1-antagonista szerekkel történő 20 perces, illetve 1 órás előkezelés hatása az enyhe hőtraumával (felső ábra), illetve a plantáris bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenésre (alsó ábra). Az adatok átlag±SEM értékek (n=6–11 csoportonként). A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérő értéket jelölnek a szolvenssel történt előkezeléshez viszonyítva (Student-féle kétmintás t-próba). A jobb oldali alsó panel a hőküszöbcsökkenés gátlására vonatkozó dózis–hatás összefüggést mutatja.

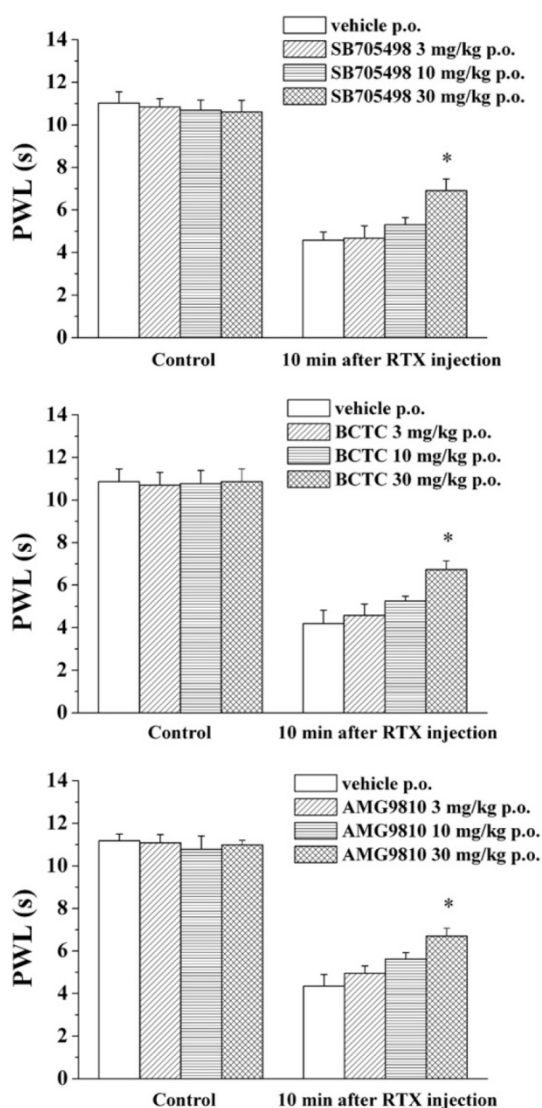


A TRPV1-antagonisták hatása az alap hőküszöbre

A kiindulási hőküszöb meghatározása után i.p. 30 mg/kg-os dózisban adott TRPV1-antagonisták egyike sem változtatta meg a bazális hőküszöböt a 30. illetve a 60. percben mérve a saját szolvenséhez viszonyítva (adatokat nem mutatunk, $n=9-9$, Student-féle kétmintás t -próbával vizsgálva).

A TRPV1-antagonisták hatása az RTX-szel kiváltott latenciaidő-meg rövidülésre

A kiindulási láb visszahúzási latenciaidő $11,0 \pm 0,3$ s volt ($n=36$), amely RTX intraplantáris injekciójának ($0,06 \mu\text{g}$) hatására $4,4 \pm 0,3$ s-re csökkent le, jelezve a termális hiperalgédia kialakulását. Mindhárom TRPV1-antagonista per os adása 1 órával az RTX előtt csak a legmagasabb, 30 mg/kg-os dózisban gátolta az RTX-szel kiváltott latenciaidő-rövidülést (**46. ábra, 6. táblázat**), hasonló gátlási százalékok mellett (SB705498: 43%, BCTC: 38%, AMG9810: 37%).



46. ábra. TRPV1-antagonista szerekkel történő 1 óras előkezelés hatása az intraplantárisan adott RTX-szel ($0,06 \mu\text{g}$) kiváltott talpelhúzási latenciaidő (PWL) - rövidülésre Hargreaves-féle plantárteszttel mérve. Az adatok átlag \pm SEM értékek ($n=6-7$ csoportonként). A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p<0,05$) eltérő értéket jelölnek a szolvenssel történt előkezeléshez viszonyítva (egyszempontos ANOVA-t követő Tukey-Kramer-teszt).

6. táblázat. A TRPV1-antagonisták minimális effektív dózisaik különböző *in vivo* nociceptív tesztekben patkányban a jelen eredmények és korábban közölt adatok (felső index jelöléssel) alapján.

Model	SB705498	BCTC	AMG9810
RTX-evoked heat threshold drop	1 mg/kg p.o.	1 mg/kg p.o.	1 mg/kg p.o.
RTX-evoked shortening of paw withdrawal latency	30 mg/kg p.o.	30 mg/kg p.o.	30 mg/kg p.o.
Heat injury-evoked heat threshold drop	10 mg/kg i.p.	3 mg/kg i.p.	1 mg/kg i.p.
Incision-evoked heat threshold drop	10 mg/kg p.o.	3 mg/kg p.o.	3 mg/kg p.o.
Capsaicin-induced secondary mechanical hyperalgesia	10 mg/kg p.o. ^a		
Capsaicin-induced eye wiping			3 mg/kg i.p. ^c
CFA-evoked thermal hyperalgesia		3 mg/kg p.o. ^b	30 mg/kg i.p. ^c
CFA-evoked mechanical hyperalgesia		3 mg/kg p.o. ^b	100 mg/kg i.p. ^c
Partial sciatic nerve ligation-evoked mechanical hyperalgesia		10 mg/kg p.o. ^b	
Partial sciatic nerve ligation-evoked mechanical allodynia		10 mg/kg p.o. ^b	

^a Rami et al. (2006).

^b Pomonis et al. (2003).

^c Gavva et al. (2005).

4.6.4. Megbeszélés

Tudomásom szerint a jelen vizsgálat volt az első, amely különböző gyógyszergyárak által kifejlesztett TRPV1-receptor-antagonistákat hasonlított össze direkt módon. Az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenést mindhárom antagonistá a legmagasabb dózisban jelentős mértékben gátolta, az SB705498 100%-ban, ami figyelemreméltó, tekintettel a lokálisan adott igen potens RTX magas koncentrációjára. Szintén hangsúlyozandó, hogy mindhárom szer már 1 mg/kg-os dózisban hatékony volt. Korábbi vizsgálatokban ezen antagonistáknak csak 3–10-szer magasabb dózisaival tudtak kimutatni termális és mechanikai antihyperalgetikus hatást (Rami *et al.*, 2006; Pomonis *et al.*, 2003; Gavva *et al.*, 2005; lásd **6. táblázat**), ami a hőküszöbmérési paradigma kiváló érzékenységet jelzi. Még inkább hangsúlyozandó, hogy a termonocicepció vizsgálatának egyik „gold standard”-jának számító plantártesztben (Hargreaves *et al.*, 1988) – ahol a küszöbfeletti ingerre adott nocifenzív reakció latenciáidejét mérik – az RTX-szel kiváltott latenciarövidülést csak 30-szor (!) magasabb dózisú antagonistával lehetett gátolni, mint ami az RTX hőküszöbcsökkentő hatásának gátlásához szükséges (**6. táblázat**). Ez azt jelenti, hogy a hőküszöbmérési paradigma a valószínűsíthetően perifériás nociceptorokon ható TRPV1-antagonisták (lásd 1.4.1.3. pont) termális szenzibilizációt gátló hatásának kimutatására sokkal érzékenyebb, mint a latenciamérésen alapuló megközelítés.

A három TRPV1-antagonistát két olyan másik modellben is összehasonlítottuk, amelyek közvetlen klinikai relevanciával bírnak: az egyik az elsőfokú égési traumával keltett akut, a másik a sebészi bemetszéssel kiváltott szubakut/krónikus hőküszöbcsökkenés, azaz termális

allodynia (lásd 4.4.3. és 4.5.3. pont). E paradigmák további előnye, hogy az antagonisták adása – a klinikai gyakorlatot utánozva – a noxa után, és nem előkezelés formájában történt. Antagonistával, illetve génhányos egerekkel végzett vizsgálatokban kimutatták, hogy a TRPV1 aktivációja/szenzibilizációja mindkét modellben szerepet játszik (Bölcskei *et al.*, 2005; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008; Banik és Brennan, 2009; 5.2.2. pont), és ezt erősítette meg a jelen kísérletsorozat is. E két modell a vizsgált TRPV1-antagonisták iránt hasonló érzékenységet mutatott, hiszen az SB705497 és a BCTC minimális hatékony dózisa azonos, míg az AMG9810-é hasonló (1 *versus* 3 mg/kg) volt. Másfajta hiperalgéziamodellekben a szerek minimális hatékony adagjai hasonlóak vagy magasabbak voltak (Rami *et al.*, 2006; Pomonis *et al.*, 2003; Gavva *et al.*, 2005; lásd **6. táblázat**), mutatva hogy e két, hőküszöbmérésen alapuló modell legalább akkora vagy nagyobb érzékenységgel mutatja ki a TRPV1 szerepét. Érdekes, hogy ugyanazon antagonisták eltérő mértékű gátlást okozott a három vizsgált allodynia-modellben: pl. az SB705497 teljesen blokkolta az RTX-allodynát, de csak 40–50%-os gátlást okozott a másik két tesztben. A BCTC esetében hasonló tendencia volt megfigyelhető. Az eltérő mértékű gátlás hátterében az állhat, hogy az RTX-szel kiváltott küszöbcsökkenésben a TRPV1-receptor szerepe értelemszerűen domináns, azonban a hőtrauma és az incízió esetében vélhetően limitált. Ezzel egybevégezve, hogy a latenciaméréssel vizsgált incíziós termális hiperalgéziában másfajta TRPV1-antagonisták (A-425619, ABT-102 és AMG0347) is csak részleges gátlást okoztak (Honoré *et al.*, 2005; 2009; Wu *et al.*, 2008). Egy lehetséges másik magyarázat, hogy a TRPV1-antagonisták hatékonysága csökken, ha a TRPV1 szenzibilizálódik (hőtrauma, incízió esetén).

Egyik tesztelt antagonisták sem módosította a kiindulási, bazális nociceptív hőküszöböt. Ez összhangban van azokkal az adatokkal, amelyeknél latenciaméréssel végzett tesztekben mutatták ki TRPV1-antagonisták (BCTC, A-425619, AMG0347 és ABT-102) hatásának hiányát patkányban a bazális hőválaszra (Pomonis *et al.*, 2003; Honoré *et al.*, 2005; 2009; Wu *et al.*, 2008). Ezen eredmények részletes diszkusszióját lásd az 5.6.2. pontban.

A preklinikai adatok alapján a TRPV1-antagonisták fejlesztése ígéretes, új irányzatnak tűnt számos gyógyszergyár számára, jelentős számú, nagy szelektivitású vegyületet eredményezve (lásd az 1.4.1.3. pont). Azonban két nem várt mellékhatás – a hipertermia és a forró ingerek detektálásának zavara – a kezdeti lelkesedést lecsökkentette. Mindazonáltal sikerült olyan vegyületet előállítani, amelyik mentes a hipertermiától, és a vannak próbálkozások a forró ingerek detektálásának megőrzésére is. Mindezek fényében a TRPV1-antagonizmus továbbra is gyógyszerfejlesztési irányzatnak tekinthető, emiatt a jelen kísérletsorozatban nyert eredmények e szerek preklinikai tesztelését jelentős mértékben támogatják.

4.7. A patkányban mért nociceptív hőküszöb csökkenésén alapuló termális allodynia-modellek összehasonlítása

Kísérleteinkben három olyan paradigmát vizsgáltunk részletesen patkányban, amelyek a nociceptív hőküszöb csökkenésén alapulnak (7. táblázat). Az RTX, az enyhe hőtrauma és a plantáris incízió hatására egyaránt lecsökkent a hőküszöb. Mindhárom esetben termális allodynia alakult ki, mivel az érzékenyített állapotokban olyan hőmérséklet váltott ki nocifenzív reakciót, amely alaphelyzetben hatástalan volt. Mint ismeretes, a hiperalgécia definíciója, hogy enyhe, *fájdalmas* inger hatására fokozott fájdalomérzet, illetve -reakció jön létre. Az RTX-hatást leíró közleményünkben allodyniról beszélünk, az enyhe hőtrauma és az incízió kapcsán viszont a hiperalgécia kifejezést használtuk. Utóbbit az indokolja, hogy – az RTX-szel szemben – e két modellt kiterjedten vizsgálták latenciadőt mérő módszerekkel, amelyeknél csak hiperalgécia mérhető. Úgy gondoltuk, hogy az irodalmi adatokkal való összevethetőség indokolja a nem teljesen egzakt szóhasználatot. A jelen disszertációban a három modellt együtt tárgyalom, emiatt az egységes és korrekt szóhasználat mellett döntöttem.

7. táblázat. Az RTX-injekció, az enyhe hőtrauma és a plantáris incízió hatására kialakuló hőküszöbcsökkenés (termális allodynia) és farmakológiai modulációjának összehasonlítása.

Modell	RTX-injekció	Enyhe hőtrauma	Plantáris incízió
Műszer: emelkedő hőmérsékletű	forró lap	vízfürdő	vízfürdő
A hőingerre adott nocifenzív reakció	láb emelése	láb kirántása	láb kirántása
A küszöbcsökkenés maximuma	8–9 °C	7–8 °C	5–7 °C
A küszöbcsökkenés maximumának időpontja	5. perc	0,5-2 óra	1–6 nap
A küszöbcsökkenés időtartama	20 perc	> 2óra	> 7 nap
A morfin minimális hatékony dózisa	1 mg/kg	0,3 mg/kg	0,3 mg/kg
A diclofenac minimális hatékony dózisa	1 mg/kg	0,3 mg/kg	1 mg/kg
A paracetamol minimális hatékony dózisa	100 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg
Közvetlen klinikai relevancia	nincs	van	van

4.8. A hőküszöbmérő készülékek és a termális allodynia-modellek validálása során nyert adatokból levonható következtetések

1./ Az emelkedő hőmérsékletű forró lappal mért nociceptív hőküszöb mérésének reprodukálhatósága kiváló 5 percenként, félóránként vagy naponként ismételt mérések során egyaránt.

2./ Az emelkedő hőmérsékletű forró lap alkalmas a morfin, a diclofenac és a paracetamol termális antinociceptív hatásának kimutatására. A morfin esetében a módszer érzékenysége legalábbbb akkora, a diclofenac esetében jóval nagyobb, mint a latenciamérésen alapuló hagyományos módszereké.

3./ Az RTX gyorsan kialakuló és fél órán belül lezajló, jelentős mértékű hőküszöbcsökkenést vált ki; ez az új termális allodynia-modell még nagyobb érzékenységgel gátolható morfinnal, diclofenac-kal és paracetamollal, mint az alap hőküszöb.

4./ Az emelkedő hőmérsékletű forró lap alkalmas az RTX lassan kialakuló, tartós, de reverzibilis deszenzibilizáló (idegvégződés-blokkoló) hatásának a kimutatására, amely a nociceptív hőküszöb emelkedésében nyilvánul meg.

5./ Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért nociceptív hőküszöb hasonlóan jól reprodukálhatóan mérhető, mint az emelkedő hőmérsékletű forró lappal mért érték.

6./ Patkányban az enyhe hőtraumával kiváltott és az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért nociceptív hőküszöbcsökkenés egy új termális allodynia-modell, amellyel mind az ópioid, mind a nem-ópioid analgetikumok hatása nagy érzékenységgel mérhető akár szisztémás, akár lokális adásmód mellett.

7./ A hőtrauma-modell érzékenysége a referencia-analgetikumok iránt hasonló, mint az emelkedő hőmérsékletű forró lappal mért RTX-allodyniáé.

8./ A nociceptív hőküszöb emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel történő mérése alkalmas a plantáris incízióval kiváltott termális allodynia kimutatására és időbeli lefutásának vizsgálatára.

9./ A nociceptív hőküszöb csökkenése nemcsak akut, hanem szubakut/krónikus paradigmákban is kimutatható.

10./ A plantáris incízió okozta hőküszöbcsökkenés morfin, diclofenac és paracetamol hasonlóan alacsony, szisztémásan, illetve lokálisan adott dózisaival gátolható, mint az enyhe hőtraumával vagy az RTX injekciójával keltett akut küszöbcsökkenés.

11./ A nociceptív hőküszöb mérése az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel alkalmas a TRPV1-antagonisták hatásának detektálására mindhárom vizsgált termális allodynia-modellben (RTX, hőtrauma, incízió). Az RTX-szel kiváltott allodynia érzékenyebben mutatja a TRPV1-antagonisták hatását, mint az enyhe hőtraumával és a plantáris bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenés.

12./ Az RTX-szel kiváltott (és az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért) hőküszöbcsökkenés egy nagyságrenddel nagyobb érzékenységet mutat a perifériás nociceptorokon ható TRPV1-antagonisták gátló hatása iránt, mint az RTX-szel kiváltott (és plantárteszttel mért) latenciaidő-rövidülés.

13./ A nociceptív hőküszöb mérésével nyert adataink alátámasztják azt a nézetet, hogy a TRPV1-receptor nem járul hozzá a patkány és az egér hátsó lábán a bazális nociceptív hőküszöb beállításához.

4.9. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő validálása egérfarkon történő hőküszöbmérésre továbbfejlesztése egérbefogó hengerek alkalmazásával

4.9.1. Előzmények és célkitűzések

Az antinociceptív gyógyszerhatások vizsgálatában mind az alap kutatásban, mind a gyógyszergyári tesztelés során kiterjedten alkalmaznak egereket. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt alkalmas készüléknek találtuk patkány hátsó lábán a nociceptív hőküszöb meghatározására különféle paradigmákban (lásd 4.4–4.6. pont). Mindezek alapján kézenfekvő igény volt a nociceptív hőküszöb mérésének kiterjesztése egérre. Tekintettel arra, hogy az egér lényegesen kisebb, mint a patkány, az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel csak az egér farkán tudtuk mérni a hőküszöböt. Elsődleges célunk az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő egérre történő adaptálása volt. Ennek részeként célunk volt nemcsak szisztémásan adott ópoid és nem-ópoid referencia-analgetikumok nociceptív hőküszöbre kifejtett hatásainak mérése, hanem vizsgáltuk e szerek pszichomotoros aktivitásra kifejtett hatásait is az „open field” módszer segítségével. Másfelől analgetikus hatástól mentes, pszichomotoros depressziót okozó referenciaszerek (antipszichotikum, anxiolitikum) hőküszöbre és „open field” tesztben kifejtett hatásainak vizsgálatát is célul tűztük ki. Mindezekon túlmenően célunk volt a hőküszöbmérés módszerének olyan módosítása, amelynél nem kell kézbevenni az egeret.

4.9.2. Módszerek

Állatok

Kísérleteinket nőstény, 25–35 g-os CD1 egereken végeztük. A kísérletet megelőző napon hoztuk az állatokat a laboratóriumba, és két hőküszöbmérést (lásd lejjebb) hajtottunk végre rajtuk habituációs célból. Ezeknek az eredményeit nem használtuk fel. A kísérleti protokoll megfelelt az Nemzetközi Fájdalomkutató Szövetség etikai követelményeinek, és azt a Pécsi Tudományegyetem Állatkísérletes Etikai Bizottsága is jóváhagyta.

A nociceptív hőküszöb mérése az egér farkán az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel

A nociceptív hőküszöböt az egerek farkán mértük meg az általunk kooperációban (Experimetria Kft, Budapest) kifejlesztett emelkedő hőmérsékletű vízfürdő segítségével. Az egeret függőleges pozícióban tartottuk gyengéd fogással a vízfürdő fölött úgy, hogy az állat farka kb. 2 cm mélyen beérjen a vízbe. A kiindulási hőmérséklet 40 °C, a fűtési sebesség 24 °C/perc volt. A tipikus végpont a farok kirántása vagy megrázása volt. Ezek bármelyikének bekövetkezésekor az állat farkát kiemeltük a vízfürdőből, a fűtést leállítottuk, és az aktuális

víz hőmérsékletet tekintettük a nociceptív hőküszöbnek. A „cut-off” hőmérsékletet 53 °C-ra állítottuk be.

Az analgetikus, illetve pszichoaktív szerek hatásainak vizsgálata során két, 20 perces időközzel elvégzett küszöbmérés eredményeinek az átlagát tekintettük a kiindulási, kontroll hőküszöbnek. Ezt követően az állatcsoport egyik felét a vizsgált szerrel, a másik felét annak szolvensével (fiziológias sóoldattal) kezeltük i.p. (0,1 ml/10 g). 30 perccel később megismételtük a hőküszöbmérést úgy, hogy a mérést végző személy nem ismerte a kezelés fajtáját. A szerek hatását a kezelés utáni és az az előtti hőküszöbök statisztikai összehasonlításával vizsgáltuk, és a hatás mértékét a hőküszöb-emelkedés nagyságával jellemeztük.

A készülék metodikai továbbfejlesztéseként kialakítottunk egy olyan elrendezést, amelynél az egeret a farok nociceptív hőküszöbének mérése során nem kell kézbe venni, mivel a mérés előtt 10 perccel egy műanyagból készült, felül zárható hengerbe kerül, amelyből lefelé kilóg a farka, a henger oldalán levő lyukak pedig biztosítják a szabad légzést (**47. ábra**).



47. ábra. Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő az egérbefogó hengerrel.

Ez az elrendezés egyrészt hosszabb adaptációs periódust tesz lehetővé, másrészt kiküszöböli a küszöbmérés egyik lehetséges hibaforrását, amely abból adódott, hogy a különböző kísérletezők nem egyforma módon fogták meg, illetve tartották az állatot, ezáltal az okozott stressz mértéke is valószínűsíthetően eltérő volt. Mindez hatással lehet a küszöbmérés eredményére, megnehezítve a különböző kísérletezők által kapott küszöbértékek összevetését. A hengerek függőleges helyzetben lógtak egy állványon, amelyen vízszintes irányban el tudtak csúszni. A küszöbmérés során a soron következő hengert a vízfürdő fölé pozicionáltuk olyan magasságban, hogy az állat

lefelé kilógó farka kb. 4 cm-re lógott be a vízbe. Ezután megindítottuk a víz felfűtését 30 °C-os kiindulási hőmérsékletről 24 °C/perc sebességgel. A fűtést addig végeztük, amíg az állat ki nem rántotta a farkát a vízből. Az ekkori vízhőmérsékletet tekintettük a fark nociceptív hőküszöbének. A „cut-off” hőmérséklet 53 °C volt. Ezt követően a kísérleti protokoll végéig az állat benn maradt a hengerben, maximum 90 percig. A következő állat hőküszöbmérésével folytatódott a kísérlet, ennek során a következő henger helyezettük a vízfürdő fölé stb.

A pszichomotoros aktivitás vizsgálata „open field” tesztben

Az állatok lokomotoros aktivitását és exploratív viselkedését az „open field” tesztben vizsgáltuk. Az egeret az 59 cm x 39 cm-es aréna közepére helyeztük, amelynek alja 16 egyforma négyzetre volt beosztva, teteje pedig nyitott volt. Az állat magatartását videokamerával rögzítettük, majd utólag elemeztük. Az alábbi három paramétert határoztuk meg az 5 perces (300 másodperces) teljes vizsgálati periódus 3 egyforma, 100 másodperces részében: meglátogatott négyzetek száma, a lokomóció időtartama, az ágaskodások száma. A gyógyszerhatások vizsgálata 1 órával az i.p. gyógyszeradás (lásd fent) után történt ugyanazon állatokban, mint amelyekben a hőküszöbre kifejtett hatást vizsgáltuk. A szerek hatását mindhárom, az „open field” tesztben mért vizsgált paraméter esetében az aktuálisan adott szolvensével hasonlítottuk össze a százalékos gátlást megadó alábbi képlet segítségével: $100 - (\text{gyógyszerrel kezelt állatban mért paraméter} / \text{szolvenssel kezelt állatban mért paraméter})$.

Az allil-izotiocianát egérfarok nociceptív hőküszöbére kifejtett hatásának vizsgálata

A mustárolaj csípős összetevője, az allil-izotiocianát (AITC) hatásának vizsgálata során először előkísérletekben vizsgáltuk a különféle vehikulumokban diszpergált AITC hatását a farkon mért nociceptív hőküszöbre. Először megmértük az egerek farkán a kontroll hőküszöböt az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel az állattartó hengerek alkalmazásával. Paraffin, 96%-os etanol vagy 30%-os dimetil-szulfoxid (DMSO, desztillált vízben) felhasználásával 5%-os AITC oldatot/emulziót készítettünk, amelybe belemártottuk az egér farkát 30 s időtartamra. Ezután 10 percenként mértük a nociceptív hőküszöböt 1 órán keresztül. A kiindulási és az adott időpontban mért aktuális küszöb különbségeként megadott hőküszöbcsökkenést hőallodyniaként értelmeztük. A második sorozatban az AITC emelkedő koncentrációinak hatását vizsgáltuk a hőküszöbre koncentráció–hatás összefüggés megállapítása céljából.

Anyagok

A morfin-klorid (Ph. Hg. VII, PTE Egyetemi Gyógyszertár, Pécs), a diclofenac-nátrium (Research Biochemicals International, Natick, USA), a metamizol-nátrium (Ph. Hg. VII, PTE Egyetemi Gyógyszertár, Pécs), a diazepam és a droperidol (mindkettő Richter Gedeon NyRT, Budapest) feloldása és hígítása fiziológiás sóoldattal történt. Az allil-izotiocianátot (AITC) a Sigma-Aldrich Ltd.-től (St. Louis, MO, USA) vásároltuk, a dimetil-szulfoxidot (DMSO), a paraffinolajat és a 96%-os etanolt a Reanal Kft-től (Budapest) szereztük be.

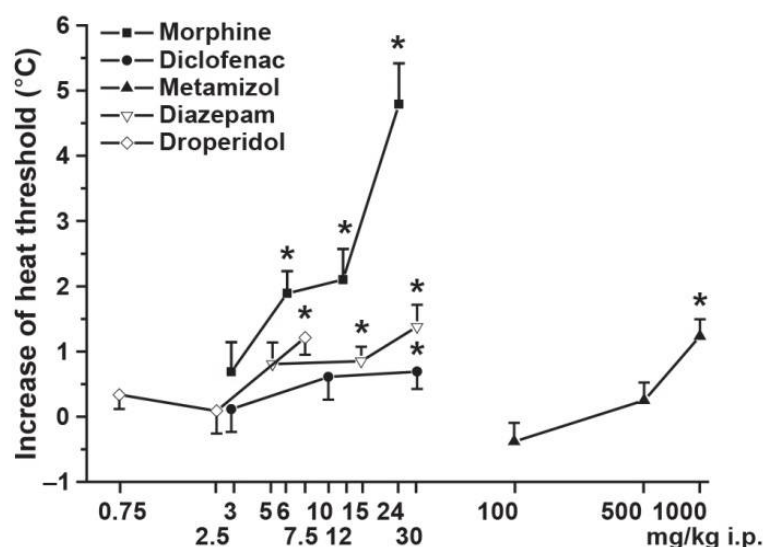
4.9.3. Eredmények

Az egérfarok nociceptív hőküszöbének reprodukálhatósága és a végpont-reakció specifikussága

Az egér farkán a kiindulási (alap) nociceptív hőküszöb $45,80 \pm 0,13$ °C ($n=106$) volt. Két küszöbmérés kezeletlen állapotban 20 perces időközzel, majd egy további mérés fiziológiás sóoldat i.p. injekciója után 30 perccel az alábbi értékeket adta (átlag \pm SEM): $45,80 \pm 0,13$, $45,79 \pm 0,13$ és $45,88 \pm 0,11$ °C ($n=106$). E három nagyon hasonló érték között nem volt statisztikailag szignifikáns különbség (Wilcoxon-tesztel vizsgálva). Ez két dologra utal: egyrészt a hőküszöb jó reprodukálhatóságára, másrészt az i.p. adott fiziológiás sóoldat hőküszöböt befolyásoló hatásának hiányára. A farokkirántási reakció specifikálásának tesztelése céljából az egerek farkát 33 °C-os, azaz a normál bőrhőmérsékletnek megfelelő hőfokú vízfürdőbe mártottuk, és azt az időt mértük, amíg bármilyen reakció be nem következett. Az állatok csak $82,5 \pm 11,9$ másodperc ($n=17$) múlva mutattak bármiféle reakciót (típusosan az egész testet involváló „küzdő” reakciót), ami jóval hosszabb időtartam, mint a „cut-off” hőmérséklet (53 °C) eléréséhez szükséges idő (32 s). Mindez azt támasztja alá, hogy a vízfürdő fűtésekor valóban nocifenzív válaszreakcióként értékelhető a farok kirántása vagy megrázása.

Referencia-analgetikumok és pszichoaktív szerek hatása a nociceptív hőküszöbre

A szerek nociceptív hőküszöbre kifejtett hatását a **48. ábra** és a **8. táblázat** mutatja. A morfin volt a leghatékonyabb és a legpotensebb (mg-os alapon): a maximális hőküszöb-emelkedés közel 5 °C volt, és a legkisebb hatékony (szignifikáns hőküszöb-emelkedést kiváltó) dózisa 6 mg/kg volt. A diclofenac és a metamizol csak a legmagasabb alkalmazott dózisban tudta megemelni a hőküszöböt, és a hatás jóval kisebb ($0,69 \pm 0,26$, ill. $1,23 \pm 0,26$ °C) volt, mint a morfin esetében. A diazepam két magasabb, míg a droperidol legmagasabb dózisa volt hatékony; a szerek maximális küszöbemelő hatása $1,38 \pm 0,33$, illetve $1,21 \pm 0,26$ °C volt.



48. ábra. Intraperitoneálisan (i.p.) adott analgetikumok, diazepam és droperidol hatása az egér farkán emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért nociceptív hőküszöbre. Az adatok átlag \pm SEM értékek (n=8–20). A csillagok statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket jelölnek a vegyület adása előtti és utáni hőküszöbértékek között (Wilcoxon-teszt).

8. táblázat. Szisztémásan (i.p.) adott szerek és kombinációik hatása az egér farkán emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért nociceptív hőküszöbre (az 1. és 2. ábra numerikus adatai) és az „open field” tesztben mért paraméterekre. Az adatok átlag \pm SEM értékek (n=8–20).

Drug treatment	Dose(s) (mg/kg)	Increase in heat threshold (°C)	Open field test (% reduction) ¹		
			Locomotion (number of units entered)	Time of locomotion	Number of rearings
Morphine	3	0.69 \pm 0.45	---	---	---
	6	1.89 \pm 0.34*	---	---	---
	12	2.10 \pm 0.47*	---	---	66;65;82
	24	4.79 \pm 0.63*	---	---	91;79;91
Diclofenac	3	0.11 \pm 0.35	---	---	---
	10	0.61 \pm 0.35	---	---	---
	30	0.69 \pm 0.26*	---	---	---
Metamizol	100	-0.38 \pm 0.29	---	---	---
	500	0.25 \pm 0.27	29;48;71	- 42;65	57;70;93
	1000	1.23 \pm 0.26*	52;49;53	---	76;77;85
Diazepam	5	0.81 \pm 0.33	---	---	60;60;70
	15	0.85 \pm 0.22*	56;78;87	- 67;75	86;94;97
	30	1.38 \pm 0.33*	96;100;100	92;100;100	100 --
Droperidol	0.75	0.34 \pm 0.22	48;71;72	55;77;77	56;76;79
	2.5	0.09 \pm 0.35	74;88;90	62;82;83	52;82;89
	7.5	1.21 \pm 0.26*	91;97;99	90;97;99	91;96;99
Diclofenac + Morphine	10 + 3	1.71 \pm 0.46*	---	---	---
Metamizol + Morphine	500 + 3	2.16 \pm 0.41*	---	---	66;78;82
Metamizol + Diclofenac	500 + 10	0.45 \pm 0.63	53;55;75	42;47;70	71;78;82
Diazepam + Morphine	5 + 3	1.98 \pm 0.50*	-- 70	-- 55	82;86;96
Droperidol + Morphine	2.5 + 3	2.30 \pm 0.55*	82;94;98	87;90;98	85;90;98

*Statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) eltérés a vegyület adása előtti és utáni küszöbértékek között (Wilcoxon-teszt).

¹A három szimbólum (–) és/vagy szám az „open-field” teszt 300 másodperces (5 perc) megfigyelési periódusának első, második és harmadik 100 másodperces részintervallumára vonatkozik. A számok azon aktivitások százalékos gátlását jelentik, amelyeket szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentett a szer az adott részintervallumban a szolvenshez képest (Student-féle kétmintás t-próba). A százalékos gátlást az alábbi képlettel számoltuk: $100 - (\text{gyógyszerrel kezelt állatban mért paraméter} / \text{szolvenssel kezelt állatban mért paraméter})$. A ‘–’ szimbólum azt jelenti, hogy az adott tevékenységet nem gátolta szignifikánsan a szer az adott részintervallumban.

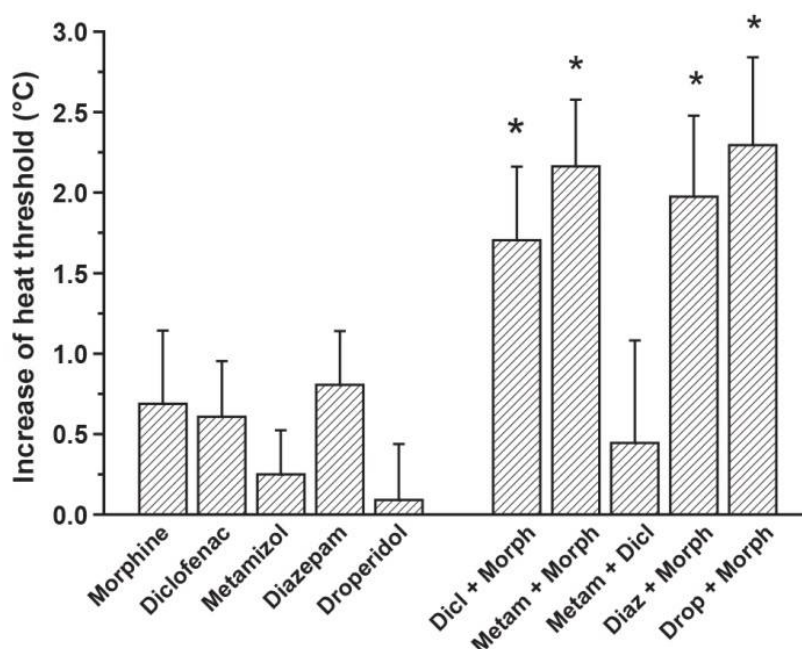
²A morfin 24 mg/kg-os dózisa nem csökkentette, hanem szignifikánsan fokozta a lokomóció idejét (adatokat nem mutatunk).

Referencia-analgetikumok és pszichoaktív szerek hatása a pszichomotoros aktivitásra

A szerek hatásait a pszichomotoros aktivitásra a **8. táblázat** foglalja össze. A morfin csak az ágaskodások számát csökkentette, lényegében csak a 12 és 24 mg/kg-os dózisokban. A diclofenac nem mutatott semmiféle hatást. A metamizol közepső és legmagasabb dózisa jelentős gátló hatást fejtett ki a legtöbb vizsgált paraméterre. A diazepam és a droperidol jelentős gátló hatásokat fejtett ki minden paraméterre nézve. Hangsúlyozandó, hogy egyik szer sem okozott narkózist vagy olyan fokú motoros blokkot, amely megakadályozta volna a nocifenzív reakciót a hőküszöbmérés során.

Gyógyszerkombinációk hatása a nociceptív hőküszöbre és a pszichomotoros aktivitásra

A morfin legkisebb alkalmazott dózisát (3 mg/kg) – amelyik mind a nociceptív tesztben, mind az open field tesztben hatástalan volt –, a diclofenac (10 mg/kg), metamizol (500 mg/kg), diazepam (5 mg/kg) és droperidol (2,5 mg/kg) olyan (legmagasabb) adagjaival kombináltuk, amelyeknek szintén nem volt szignifikáns hőküszöbmelő hatása. E gyógyszerkombinációk hatását a nociceptív hőküszöbre és a pszichomotoros aktivitásra a **49. ábra** és a **8. táblázat** mutatja. Az összes kombináció (kivéve a diclofenac–metamizol párost) szignifikánsan megemelte a nociceptív hőküszöböt, vagyis a szerek mindegyike hatékonyra tette a küszöbalatti morfindózist.



49. ábra. I.p. adott analgetikumok és pszichoaktív szerek, illetve kombinációik hatása az egér farkán emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért nociceptív hőküszöbre. Az adatok átlag±SEM értékek (n=8–20). A csillagok statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket jelölnek a kombináció adása előtti és utáni hőküszöbértékek között (Wilcoxon-teszt). Morph: morfin 3 mg/kg, Dicl: diclofenac 10 mg/kg, Metam: metamizol 500 mg/kg, Diaz: diazepam 5 mg/kg, Drop: droperidol 2,5 mg/kg.

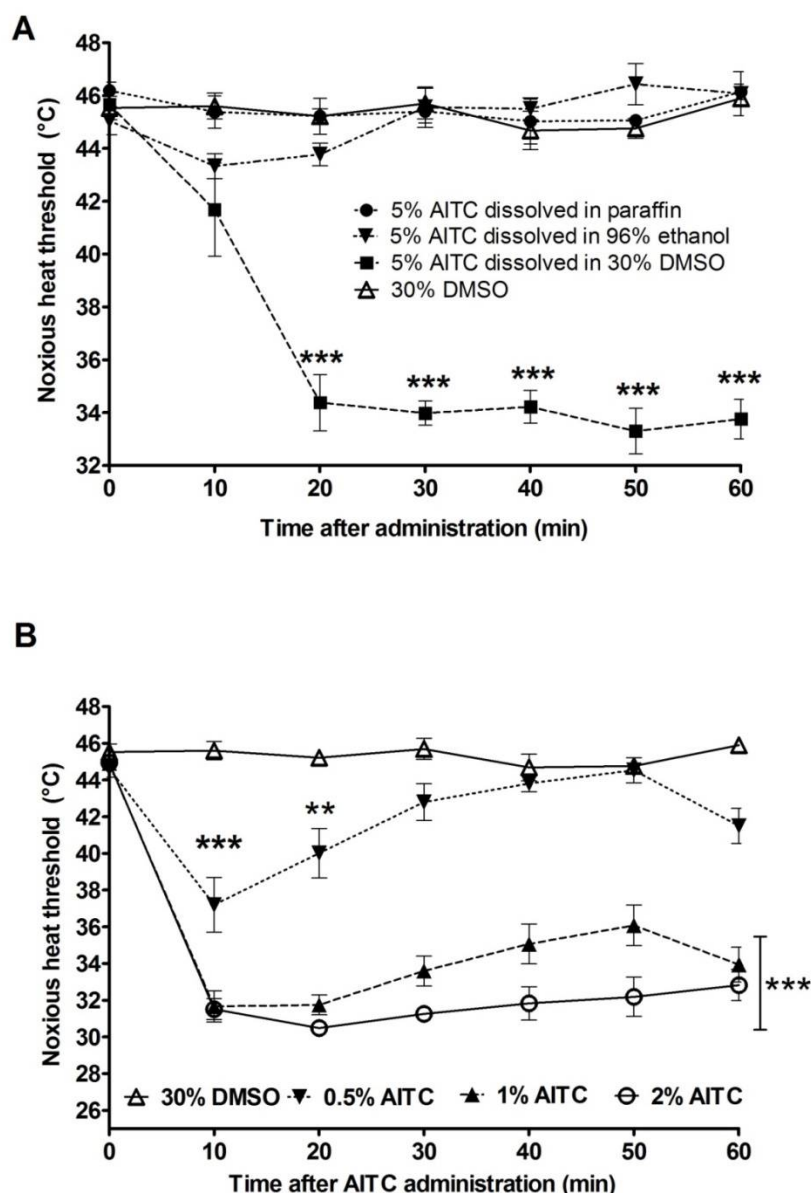
A morfin diclofenac-kal történő kombinációja esetén nem volt pszichomotoros gátlás, míg a morfin plusz metamizol esetében kisebb volt, mint a metamizol egyedüli alkalmazásakor. A morfin diazepammal vagy droperidollal történő kombinációja esetén a pszichomotoros gátlás csak kissé volt nagyobb, mint a pszichoaktív szer egyedüli alkalmazásakor.

Az AITC hatása a farok nociceptív hőküszöbére (állattartó hengerek alkalmazásával) különböző vehikulumok és koncentrációk esetében

Ebben a sorozatban az AITC hőküszöbre kifejtett hatását vizsgáltuk az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő és az állattartó hengerek alkalmazásával az 5.6. pontban tárgyalt kísérletek előzményeként abból a célból, hogy meghatározzuk az egér farkára alkalmazott AITC optimális vehikulumát és koncentrációját. Az **50. ábra felső paneljének** tanúsága szerint az 5% AITC 30% DMSO-ban oldva/emulgeálva – ellentétben a paraffinban vagy 96%-os etanolban adott szerrel – statisztikailag szignifikáns és jelentős mértékben, mintegy 10–11 °C-kal lecsökkentette a nociceptív hőküszöböt úgy, hogy a vehikulum (30% DMSO) önmagában nem befolyásolta azt. Megjegyzendő, hogy sporadikus jelleggel az AITC már szobahőmérsékleten is a farokra lokalizálódó nocifenzív reakciót (farok rázása) váltott ki. Eredményeink szerint a háromféle vehikulum közül a 30% DMSO képes arra, hogy utat nyisson az AITC számára az egér farkán a bőr mélyebb rétegeiben levő termonociceptorokhoz, és azokra hatva az AITC le tudja csökkenteni a nociceptív hőküszöböt. Az **50. ábra alsó panelje** szerint a 30% DMSO-ban adott 0,5 %-os AITC csak 5–7 °C-os, a beadás utáni első 20 perces időszakra korlátozódó hőküszöbcsökkenést váltott ki, ezzel szemben az 1 és 2% AITC jelentős mértékben (10–14°C-kal) és a teljes vizsgálati periódusban (60 perc) lecsökkentette a hőküszöböt. Az 1 és 2%-os AITC küszöbcsökkentő hatása hasonló mértékű volt, azonban az utóbbi alkalmazása során alkalmanként rövid ideig tartó nocifenzív reakció (farok rázása) volt megfigyelhető, ami megzavarhatja a hőküszöbmérést. Ezért a 30% DMSO-ban mint vehikulumban alkalmazott 1%-ot (100 mM) tekintettük az AITC olyan küszöbközeli koncentrációjának, amely már jelentős hőküszöbcsökkenést okoz az egér farkán anélkül, hogy nocifenzív reakciót váltana ki. Emiatt az AITC-vel kapcsolatos további kísérleteinkben (lásd 5.6. pont) ezt a koncentrációt alkalmaztuk.

4.9.4. Megbeszélés

A jelen kísérletsorozatban az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel a CD1 egerek farkán meghatározott nociceptív hőküszöb ($45,80 \pm 0,13^\circ\text{C}$) hasonló, mint a korábbi kísérleteinkben C57Bl/6 egerek hátsó végtagjának a talpán az emelkedő hőmérsékletű forró lappal meghatározott



50. ábra. Az allil-izotiocianát (AITC) hatása az egérfarok nociceptív hőküszöbére, amelyet állattartó hengerekkel kiegészített emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mértünk. Az adatok átlag±SEM értékek (n=6–9). **: p<0,01, ***: p<0,001. **A panel:** Hőküszöbértékek a farok 30 másodpercig tartó, 5% AITC-be történő mártása előtt és 10–60 perccel az után különböző szolvensek (paraffin, 96% etanol, 30% DMSO) alkalmazása esetén. A 30%-os DMSO hatását összehasonlítás céljából mutatjuk. A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelölnek a kiindulási küszöbhez képest (egyszempontos ANOVA utáni Bonferroni-teszt). **B panel:** Különböző AITC-koncentrációk (0,5, 1 és 2%; 30% DMSO-ban oldva) hatása a nociceptív hőküszöbre a farok bemártása előtt és 10–60 perccel az után a szolvenshez viszonyítva. A csillagok statisztikailag szignifikáns hőküszöbcsökkenéseket (kontroll küszöb mínusz adott időpontban mért küszöb) jelentenek a szolvens által kiváltotthoz képest (kétszempontos ANOVA utáni Bonferroni-teszt).

hőküszöb (45,2±0,4 °C; lásd 4.3.3. pont). Az a tény, hogy az egerek farkuk nem fájdalmasan meleg (33 °C-os) vízbe mártása során csak a „cut-off” hőmérséklet eléréséhez szükségesnél jóval hosszabb idő múlva mutattak az egész testet involváló „küzdő” reakciót, azt igazolja, hogy a farok kirántása nocifenzív reakcióként értékelhető. Mivel az NSAID típusú analgetikum

diclofenac legmagasabb dózisa (30 mg/kg) megemelte a nociceptív hőküszöböt anélkül, hogy befolyásolta volna a pszichomotoros aktivitást, valódi antinociceptív effektusként értékelhető a hőküszöb megemelkedése. Ez összhangban van azzal, hogy korábbi vizsgálatunkban a diclofenac képes volt az emelkedő hőmérsékletű forró lappal mért nociceptív hőküszöb emelésére patkány hátsó lábán (lásd 4.3.3. pont). Említésre érdemes, hogy szintén egérben a sugárzó hőt alkalmazó tail-flick módszerrel mérve az 50 mg/kg diclofenac nem növelte meg a latenciaidőt (Dogrul *et al.*, 2007), mutatva a hőküszöbmérésen alapuló paradigma nagyobb érzékenységét ezen analgetikum iránt.

Jelen vizsgálataink a morfin valódi antinociceptív hatását is igazolták az alábbi megfontolások alapján: (i) a szer dózisfüggően megemelte a hőküszöböt, és maximális alkalmazott dózisa jelentékeny, közel 5 °C-os hőküszöb-emelkedést okozott; (ii) minimális effektív dózisa (6 mg/kg) csak az ágaskodások számát csökkentette az „open field” tesztben; (iii) két magasabb dózisa is csak az ágaskodásokra hatott, hasonló mértékben, de ezeknél a dózisoknál a küszöbemelkedés jelentősen különbözött; (iv) a diazepam és a droperidol magasabb adagjai jelentős pszichomotoros gátlás mellett csak jóval kisebb küszöbemelkedést okoztak, mint a morfin. A hagyományos, latenciamérésen alapuló nociceptív tesztekben (forró lap, „tail-flick”) legkevesebb 5–10 mg/kg morfin hatását lehetett kimutatni egérben (Milano *et al.*, 2008; Bukhari *et al.*, 2010; Ramirez *et al.*, 2010), ami azt jelzi, hogy a küszöbmérési paradigma érzékenysége legalább akkora a morfinnal szemben, mint a latenciamérése. A metamizol csak a legmagasabb (1000 mg/kg) alkalmazott dózisban emelte meg a nociceptív hőküszöböt, jelentős pszichomotoros gátlás mellett. Adataink fényében a pszichomotoros gátló hatások szerepét sem kizárni, sem azok mértékét megbecsülni nem tudtuk a metamizol hőküszöbemelő hatásában. Figyelembe veendő az is, hogy a forró lappal, illetve „tail-flick” teszttel vizsgálva már 400–500 mg/kg metamizol antinociceptív hatását ki tudták mutatni egérben (Milano *et al.*, 2008; Fialip *et al.*, 1989; Pakulska és Czarnecka, 2009). Mindezek alapján elmondható, hogy a metamizol vizsgálatára egérben a hőküszöbmérés nem preferálandó módszer.

Adataink azt is alátámasztják, hogy akár egy jelentős pszichomotoros gátló hatás sem vezet feltétlenül a nociceptív hőküszöb emelkedéséhez: a diazepam, a droperidol és a metamizol kisebb-nagyobb gátló hatása az „open field” tesztben nem társult hőküszöbemelő hatással. Ez arra utal, hogy az emelkedő hőmérsékletű vízfürdőben a farokkirántási reakció nagymértékben specifikus a nocicepcióra, másrészt összecseng a klinikai tapasztalattal, amely szerint sem a benzodiazepinek, sem a butirofenon típusú antipszichotikumok nem rendelkeznek analgetikus hatással, legalábbis standard terápiás adagjaikban. A diazepam és a droperidol magasabb dózisaival kiváltott hőküszöb-emelkedést illetően figyelembe kell venni, hogy bár e szerek az „open

field” tesztben számottevő pszichomotoros gátló hatásokat mutattak, nem valószínű, hogy közvetlenül a farokkirántás spinális szinten integrálódó reflexének (Irwin *et al.*, 1951; Bonnycastle *et al.*, 1953; Sinclair *et al.*, 1988) motoros komponensét gátolják.

Kísérleteinkben a diclofenac és a metamizol – klinikailag jól ismert – morfinspóroló hatását is sikerült demonstrálni, amennyiben e szerek küszöbalatti antinociceptív dózisa együttadva a morfin szintén szubliminális dóziséval, szignifikáns hőküszöb-emelkedést okozott. Mivel a diclofenac-kal való kombináció semmilyen, a metamizollal történő pedig kisebb pszichomotoros gátlást okozott, mit a metamizol önmagában, az antinociceptív hatások interakciója állhat a jelenség hátterében. A hőküszöb-emelkedések összehasonlítása alapján elmondható, hogy a morfin–diclofenac interakció additív jellegű ($0,69\text{ }^{\circ}\text{C} + 0,61\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 1,71\text{ }^{\circ}\text{C}$), míg a morfin és a metamizol együttthatása szupraadditív ($0,69\text{ }^{\circ}\text{C} + 0,25\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 2,16\text{ }^{\circ}\text{C}$) minősíthető. Meglepő módon a diclofenac és a metamizol antinociceptív hatása nem adódott össze, sőt a kombináció gyengébben hatott ($0,61\text{ }^{\circ}\text{C} + 0,25\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 0,45\text{ }^{\circ}\text{C}$).

A küszöbalatti morfindózis diazepammal vagy droperidollal való kombinálása is úgy emelte meg a hőküszöböt, hogy a pszichomotoros gátlás csak minimálisan volt nagyobb, mint a pszichoaktív szeré önmagában. A morfin–diazepam kombináció okozta antinociceptív hatás esetében esetében inkább additív ($0,69\text{ }^{\circ}\text{C} + 0,81\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 1,98\text{ }^{\circ}\text{C}$), míg a morfin–droperidol páros esetében egyértelműen szupraadditív kölcsönhatás ($0,69\text{ }^{\circ}\text{C} + 0,09\text{ }^{\circ}\text{C} \rightarrow 2,30\text{ }^{\circ}\text{C}$) alakult ki. A diazepam és a droperidol morfinspóroló effektusa felveti annak lehetőségét, hogy alacsony dózisú anxiolitikum vagy neuroleptikum érzékenyítheti a termociceptív teszteket az ópoidok iránt. Eredményeink hangsúlyozzák annak fontosságát, hogy magatartási reakciókat is alkalmazzanak az antinociceptív gyógyszerhatások preklinikai vizsgálatokor, ahogy erre szakirodalmi ajánlás is található (Negus *et al.*, 2006; Mogil, 2009).

Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő égetartó hengerekkel kiegészített változatának értékelése

Kísérleteink során pozitív tapasztalatokat szereztünk az egérfarok hőküszöbmérésénél alkalmazott állattartó hengerek használatával kapcsolatban, amennyiben ez lehetővé tette egyrészt az állat megfogásából eredő stressz állandóvá tételét, másrészt a mérést végző személy „állatmegfogási” módszerének variabilitásából származó hiba kiküszöbölését. A hengerben levő állatok folyamatos, de állandó mértékű immobilizációja éles ellentétben áll a hagyományos, kézzel történő megfogás esetén alkalmazott fluktuáló „restraint”-jével (amikor az állat minden mérés alkalmával ismételt stressznek van kitéve a megfogással és a ketrecbe való visszahelyezéssel összefüggésben). A hallgatólagos feltételezéssel ellentétben az egerek gyakorlatilag nem habituálódnak az ismételt kézbevételekhez (Balcombe *et al.*, 2004; Longordo

et al., 2011). Az alkalmazott metodikai fejlesztés létjogosultságát eredményeink is alátámasztják, miszerint a 30% DMSO-val végzett perkután kezelés után 7 alkalommal, 10 perces időközökkel mért hőküszöbök nem mutattak szignifikáns eltérést. Minthogy a gyógyszergyári vizsgálatoknak egyik fontos kritériuma a minél nagyobb fokú standardizálhatóság, a küszöbmérést végző személy manuális beavatkozásából eredő variabilitásnak a kiküszöbölése és a módszer automatizálhatóságának lehetősége a metodikai fejlesztést az ipari környezetben zajló tesztelés számára is vonzóvá teheti.

4.9.5. Fontosabb következtetések

1./ A nociceptív hőküszöb jól reprodukálható mérése az egér farkán az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel alkalmasnak bizonyult ópoid és nem ópoid analgetikum termális antinociceptív hatásának érzékeny módon történő kimutatására, kiterjesztve a hőküszöbmérési paradigma alkalmazhatóságát egérre.

2./ A hőküszöbmérési paradigma segítségével analgetikumok közötti, illetve analgetikum és pszichoaktív szer közötti antinociceptív interakció is kimutatható volt.

3./ Az antinociceptív tesztek kiegészítése a pszichomotoros aktivitást mérő módszerekkel ajánlatos, mivel megbízhatóbbá teheti a fájdalomteszteket.

4./ Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő állattartó hengerekkel kiegészített formájában alkalmas az egér farkán a nociceptív hőküszöb objektív meghatározására, kiküszöbölve az állat kézbentartásából eredő stresszből és annak variabilitásából eredő zavaró hatást.

5. A NOCICEPTÍV HŐKÜSZÖB MÉRÉSÉNEK ALKALMAZÁSA A TRPV1-RECEPTOR FUNKCIÓJÁNAK ÉS A TERMONOCICEPCIÓ MECHANIZMUSAINAK VIZSGÁLATÁBAN

Ebben a fejezetben olyan kísérleti eredményeket mutatok be, amelyeket nagyjából a nociceptív hőküszöb mérésével nyertünk. Ezekben a vizsgálatokban a emelkedő hőmérsékletű forró lapon vagy az emelkedő hőmérsékletű vízfürdőben végzett hőküszöbmérést mint eszközt alkalmaztuk valamely elméleti probléma analízise során. A vizsgálatok mindegyike – legalábbis részben – a TRPV1-receptor valamely aspektusával foglalkozott, és a termonocicepció tágabban értelmezett fogalomkörébe sorolható be.

5.1. Módszerek

Állatok

Kísérleteink zömét 140–200 g-os nőstény Wistar patkányokon (Charles River Hungary Ltd, Budapest) végeztük (ha nem említek fajt, patkányra vonatkozik a metodikai leírás az alábbiakban). Egy sorozatban TRPV1- (TRPV1^{-/-}), illetve TRPA1-génhiányos (TRPA1^{-/-}) egereket, valamint vad típusú megfelelőiket (TRPV1^{+/+} és TRPA1^{+/+}) vizsgáltuk. A TRPV1^{-/-} tenyészpárokat a The Jackson Laboratory (Sacramento, CA, USA) cégtől vásároltuk. A szállító instrukciójának megfelelően a TRPV1^{-/-} egereket homozigótaként tenyésztettük, és C57Bl/6J egereket használtunk vad típusú kontrollként. A TRPA1^{-/-} and TRPA1^{+/+} egereket Prof. P. Geppetti (Firenzei Egyetem, Olaszország) által adományozott heterozigóta tenyészpár felhasználásával tenyésztettük. Az utódokat genotipizáltuk, majd a homozigóta egyedeket tovább tenyésztettük 4 generáción keresztül, stabil homozigóta TRPA1^{-/-} and TRPA1^{+/+} vonalat nyerve. Az állatok 3–4 hónaposak voltak, kivéve az idősödő nőstényeket, amelyek 12–13 hónaposak voltak. A kísérletet végző személy nem ismerte az állatok genotípusát.

A nociceptív hőküszöb mérése az emelkedő hőmérsékletű forró lap vagy az emelkedő hőmérsékletű vízfürdő alkalmazásával patkány hátsó lábán

E módszerek leírását lásd a 4.3.2. és 4.4.2. pontokban. A proteinkináz-gátlók hatásainak elemzése során a hőküszöbméréshez a Supertech Kft. (Pécs, Magyarország) által gyártott emelkedő hőmérsékletű forró lapot használtuk. A nociceptív hőküszöb és az RTX-szel kiváltott küszöbcsökkenés mérésének részleteit lásd a 4.3.2. pontban. Az RTX-et 0,5 μ M koncentrációban adtuk intraplantárisan (100 μ l), míg a facilitáló hatású proteinkináz-serkentők alkalmazásakor 10-szer alacsonyabb (0,05 μ M) koncentrációt használtunk az esetleges okklúzió elkerülése

céljából. Az RTX adása után a hőküszöböt az 5. percben mértük. A protein-kinázok aktivitását módosító szereket intraplantáris előkezelés formájában alkalmaztuk 5 perccel az RTX adása előtt: az állatcsoport fele a szert, a másik fele annak szolvensét kapta. Más kísérleteinkben az IITC Life Sciences Inc. (Woodland Hills, CA, USA) által gyártott „incremental hot/cold plate analgesia meter”-t használtuk. A készülék emelkedő hőmérsékletű üzemmódban a forró küszöb, csökkenő hőmérsékletű üzemmódban a nociceptív hideg küszöb mérésére alkalmas (lásd lejjebb). Amennyiben TRPV1-receptor-agonizmus kimutatása volt a cél, a kiindulási (kontroll) hőküszöb meghatározása után a tesztelt vegyületet intraplantárisan (100 µl) alkalmaztuk, majd 5 percenként ismételten mértük a kezelt láb hőküszöbét. A TRPV1-receptor-antagonista hatás kimutatása céljából a korábban validált RTX-allodynia modellt (4.3. pont) alkalmaztuk. Az RTX adása előtt 5 perccel az állatcsoport egyik felét a vizsgált szerrel, a másikat annak szolvensével kezeltük elő intraplantárisan (50 µl). Öt perccel később az RTX-et 50 µl térfogatban adtuk szintén intraplantárisan. Legutóbbi kísérleteinkben az emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt alkalmaztuk (lásd 4.4.2. pont).

A nociceptív hideg küszöb meghatározása patkányban hátsó végtagjának talpi részén

A nociceptív hideg küszöb meghatározásához is az „incremental hot/cold plate analgesia meter”-t (IITC Life Science, Woodland Hills, CA, USA) használtuk. A nociceptív hideg küszöb mérésénél annyiban módosult a paradigma, hogy 25 °C-os kiindulási hőmérsékletet és 6 °C/perc hűtési sebességet alkalmaztunk; a hűtést addig folytattuk, amíg az állat valamelyik hátsó végtag nyalásával vagy emelésével nem válaszolt. Az ekkor mért laphőmérsékletet tekintettük a nociceptív hideg küszöbnek. A „cut-off” érték 0 °C-ra volt beállítva, de a lap spontán tovább hűlt –1 °C-ra, ezért az utóbbi értéket tekintettük a végértéknek.

Tesztanyagok hatásának vizsgálata a hőtraumával vagy sebési bemetszéssel kiváltott termális allodynia-modellben

Az enyhe hőtraumával és a sebési bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenés vizsgálatának leírását lásd a 4.4.2. és 4.5.2. pontban. Mindkét modell esetében a tesztanyagot vagy annak szolvensét intraplantáris injekció (100 µl) formájában adtuk a hőküszöbcsökkentő noxa alkalmazása után 10 perccel (hőtrauma) vagy 18 órával (bemetszés) történő hőküszöbmérést követően. Ezután 10 percenként történt hőküszöbmérés, összesen 4 alkalommal. A szerek hatását statisztikailag a 10. és 20. percben mért küszöbcsökkenés összege alapján ítéltük meg és százalékban fejeztük ki a korábban már említett képlet segítségével (4.2. pont).

Patkány TRPV1-receptorral transzfektált HT5-1 sejtek $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételének vizsgálata

A különféle ágensekkel kiváltott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételt a HT5-1-es sejtvonal sejtjeiben vizsgáltuk. A HT5-1 sejtvonal a HT-10180-as humán fibrosarcoma sejtvonal derivátuma. A HT5-1 sejtekbe a patkány TRPV1 cDNS-ét tartalmazó expressziós vektort (pEGFP-N1; Clontech) juttattunk be (Sándor *et al.*, 2005). A transzfektált sejtvonalban a sejtek 75%-a expresszálta a TRPV1–EGFP fúziós fehérjét, amely hasonló tulajdonságokkal bír, mint a natív TRPV1-receptor. A sejteket Dulbecco-féle módosított médiumban (D-MEM; Gibco) növesztettük, amelyet 10% borjúsérummal, nem-esszenciális aminosavakkal és antibiotikumokkal szupplementáltunk. A sejteket 3–4 naponként 1:10 arányban passzáltuk. A kísérletet megelőző napon lyukanként kb. 2500 HT5-1 sejtet helyeztünk ki 72 lyukú Microwell Minitrays (Sigma M-0690) tenyésztő lemezekre 15 μl médiumban. A következő napon a sejteket ötször mostuk HEPES-oldattal (10 mM, pH: 7,4), amelyet magnézium- és kalciummentes Hank-féle sóoldattal pufferoltunk, amelyhez 2 mM kalcium-kloridot adtunk. Amennyiben TRPV1-agonizmus detektálása volt a cél, a sejteket 10 μl ugyanolyan pufferoldatban inkubáltuk 5 percig szobahőmérsékleten, amely tartalmazta a tesztelt vegyület kívánt mennyiségét és 200 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -izotópot (1,3 Ci/mmol, Amersham). Ha TRPV1-antagonizmus kimutatása volt a cél, a sejteket 15 percig előinkubáltuk a vizsgált szerrel szobahőmérsékleten. Ezután a szert kicseréltük a szer, 100 nM kapszaicin és 200 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -izotóp keverékére, és a sejteket 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Az inkubáció után a sejteket ötször mostuk pufferrel (5 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 12 mM glükóz, 10 mM HEPES, pH 7,4, 137 mM szacharóz, 5,8 mM NaCl és 0,75 mM CaCl_2). A puffer maradékát 10 percig 75 °C-on párologtattuk el. A tenyésztőlemez lyukaira 10 μl 0,1%-os nátrium-dodecil-szulfátot adtunk a sejtekbe felvett izotóp összegyűjtése céljából, majd a radioaktivitást 2 ml szcintillációs folyadékban mértük Tri-Carb 2800 TR (Packard) szcintillációs számlálóval.

Az intracelluláris Ca^{2+} -szignálok mérése fura-2 mikrofluorimetriával HT5-1 sejtvonal sejtjeiben és patkány tenyésztett trigeminális neuronjaiban

Az egyedi sejtek szintjén a Ca^{2+} -felvételt fluoreszcens raciométrikus Ca^{2+} -„imaging” módszerrel vizsgáltuk fura-2 festékkel töltött HT5-1 sejtekben, illetve trigeminális neuronokban. A HT5-1 sejtvonal leírását lásd feljebb. A trigeminális neuronok primer kultúráját 2–4 napos újszülött Wistar patkányok trigeminális dúcából készítettük kollagenáz (XI-es típus) és dezoxiribonukláz-I (IV-es típus) alkalmazásával (a módszer további részleteit illetően lásd Szőke *et al.*, 2000). A tápanyagokkal kiegészített tenyésztő médium 85 ml D-MEM-et, 5 ml

lósérumot, 5 ml főtális marha albumint, 5 ml újszülött borjú szérumot, 2×10^5 NE/ml penicillint és 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycint tartalmazott. NGF-t (200 ng/ml) minden második nap adtunk hozzá.

A HT5-1 sejteket, illetve a trigeminális neuronokat 30 percig inkubáltuk 1 μM fura-2 AM-t (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) tartalmazó inkubációs pufferben. A festékekkel feltöltött sejteket szobahőmérsékleten vizsgáltuk extracelluláris pufferoldatban (ECS: 160 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM glükóz, pH 7,3). A vizsgált vegyületet ECS-ben oldottuk fel, és SF-77B perfúziós gyors léptetésű rendszerrel (Warner Inc.) adagoltuk. Az analízist Olympus BX50WI (Tokió, Japán) fluoreszcens mikroszkóp felületén végeztük felváltva 340, illetve 380 nm-es monokromátorral (Polychrome II., Till Photonics, Gräfelfing, Németország) generált fénnyel. Az 510 nm-en egy adott lapon 2–18 elkülönült területről kibocsátott fluoreszcenciát digitális kamerával (CCD, SensiCam PCO, Kelheim, Németország) detektáltuk. 1–10 festékekkel töltött sejtet választottunk ki látóterenként az egyes sejtek fluoreszcenciájának vizsgálatához. A fluoreszcenciaintenzitás-arányokat az idő függvényében a neuront lefedő kis területeken (ROI-k), kb. 800–1500 pixelen határoztuk meg. A felváltva alkalmazott 340, illetve 380 nm-es gerjesztő fény hatására kibocsátott, 510 nm-nél nagyobb hullámhosszúságú fényintenzitás-arányokat 1 Hz-es frekvenciával detektáltuk. Az adatok rögzítéséhez és a raciométrikus 340/380-arány analíziséhez Axon Imaging Workbench 2.1 (Axon Instruments, CA, USA) szoftvert használtunk. A gyűjtött adatok további feldolgozásához a Microcal Origin 7.0 programot (Originlab Corporation, Northampton, MA, USA) alkalmaztuk. A kiindulási (alapvonal) fluoreszcencia leolvasása a sejtek szerrel történő expozíciója előtt történt. Ezt követően az alapvonalat az $R=0$ értékre állítottuk, majd a raciométrikus érték maximumának meghatározása történt meg. A neuronokat akkor tekintettük kapszaicin-, RTX-, vagy káliumérzékenynek, ha a raciométrikus érték maximuma meghaladta a 0,1-et. Egy adott szerre érzékeny sejtek százalékos arányát úgy határoztuk meg, hogy a 0,1-nél nagyobb választ adó sejtek számát osztottuk a vizsgált sejtekével (ezt az ROI-k számából tudtuk meg), majd ezt az értéket 100-zal megszoroztuk. A kísérletek során két egymást követő expozíció történt valamely Ca^{2+} -tranzienst kiváltó ágenssel (kapszaicin, RTX, KCl) 3 s időtartamra, amelyeket ECS-sel vagy aktív szerrel történő mosás választott el egymástól.

A nocifenzív reakció vizsgálata vad típusú és TRPV1-receptorhiányos egerekben

Az OLDA fájdalomkeltő hatását vad típusú (C57Bl/6) és TRPV1-receptor génhiányos egereken vizsgáltuk. Utóbbiakat dr. John B. Davis, GlaxoSmithKline, Harlow, UK bocsátotta rendelkezésünkre. Az OLDA-t (50 nmol) intraplantáris injekcióban adtuk, és a kiváltott nocifenzív reakció (láb nyalása, emelése) időtartamát mértük.

Idegátmetzés patkány jobb hátsó végtagján és az idegátmetzett láb kémiai izgatása

Pentobarbital-narkózisban (50 mg/kg i.p.) a jobb hátsó lábon feltártuk a n. saphenust és a n. ischiadicust, majd éles ollóval átvágtuk mindkét ideget. Ezután a műtéti sebet varrattal zártuk. A kísérletek többségében az idegátmetzés (és az ugyanazon ülésben elvégzett plantáris bemetszés, lásd lejjebb) után 18 órával (szubakut denerváció) történt az állatok vizsgálata a nociceptív tesztekben. Egy állatcsoport esetében krónikus denerválást végeztünk oly módon, hogy a plantáris incíziót 4 nappal és 6 órával az idegátmetzés után ismételt narkózisban végeztük el, és az állatok vizsgálata a nociceptív tesztekben 18 órával ez után (azaz az idegátmetzés után 5 nappal) történt, amikor a decentralizált idegvégződés degenerálódott (lásd lejjebb). A kapszaicint vagy annak szolvensét intraplantáris injekció (100 μ l) formájában adtuk a idegátmetzett jobb hátsó végtag talpának bőre alá. A mustárolajat vagy annak szolvensét vattapálcika segítségével kentük a jobb hátsó láb bőrére.

A mustárolajjal kiváltott plazma-extravazáció vizsgálata a hátsó lábon az idegátmetzés utáni különböző időpontokban

Annak megítéléséhez, hogy 18 órával az idegátmetzés után megváltozott-e a peptiderg nociceptorok neuropeptid-kibocsátó funkciója, megmértük a mustárolajjal kiváltott plazma-extravazációt a denervált hátsó lábon *in vivo* fluoreszcencia-„imaging” segítségével az idegátmetzés után közvetlenül, 18 óra, illetve 5 nap elteltével. Ennek során ketamin–xylazinnal (72–8 mg/kg i.p.) altatott patkányokban 0,5 mg/kg indocianin-zöld festéket adtunk i.v., majd az idegátmetzett jobb hátsó végtagon 5%-os mustárolajat alkalmaztunk a bőrre kenve. A fluoreszcenciát 20 perccel a mustárolaj alkalmazása után mértük a kezelt és a kontrollként szolgáló ellenoldali (bal) hátsó lábon optikai detektorral (IVIS Lumina II; Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). A fluoreszcens jel analízisét Living Image szoftver segítségével végeztük. Mivel ez a módszer a keringésben levő és az extravazálódott fluoreszcens festék együttes mennyiségét méri, a vizsgált végtagon mért értékből kivontuk az ellenoldali láb értékét, és az ily módon normalizált értékeket használtuk a statisztikai analízishez.

A kapszaicinérzékeny érzőideg-végzések deszenzibilizációja a jobb hátsó láb talpi részén

A kapszaicinérzékeny nociceptorok funkciójának „kikapcsolása” (idegvégződés-szintű deszenzibilizáció, lásd 1.4.1.5. pont) érdekében 3 nappal a távoli antiallodyniás hatás vizsgálata előtt 100 μ g kapszaicint adtunk i.pl. a jobb hátsó lábba olyan állatokban, amelyek nem estek át idegátmetzésen. Saját adataink szerint ez a dózis a kapszaicinérzékeny idegvégzések olyan funkcionális károsodását eredményezi, amely nem korlátozódik a TRPV1-receptorok csökkent

válaszkészségére, hanem a terminális általános funkciócsökkenését foglalja magába (lásd 5.7.2. pont). A kontrollállatokat a kapszaicin szolvensével kezeltük hasonló módon.

A sebészi bemetszéssel kiváltott termális allodynia vizsgálata a bal hátsó lábon

A bal hátsó láb kiindulási nociceptív hőküszöbét az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel határoztuk meg (lásd 4.4.2. pont), és ezt az értéket tekintettük preoperatív kontrollnak. Ezt követően ugyanabban az ülésben az altatott állatokon elvégeztük a jobb hátsó lábon az idegátmetszést (lásd fent), és a bal hátsó lábon a standardizált plantáris bemetszést (lásd 4.5.2. pont). 18 órával később, a narkózis hatásainak teljes elmúltával ismét meghatároztuk a bal láb nociceptív hőküszöbét, és ezt az értéket tekintettük posztoperatív kontrollnak. Azokat az állatokat, amelyekben az incízó okozta hőküszöbcsökkenés 3 °C-nál kisebb volt, kizártuk a további vizsgálatból. Az ellenoldali (jobb) láb kapszaicinnel, illetve mustárolajjal (vagy ezek szolvensével) történő kezelését követően a bemetszett (bal) lábon 10 percenként mértük a nociceptív hőküszöböt 40 percen át.

A n. ischiadicus részleges lekötésével kiváltott neuropátiás mechanikai allodynia vizsgálata a bal hátsó lábon

Limitált számú kísérletben a bal hátsó végtagon nem termális allodynát váltottunk ki sebészi bemetszéssel, hanem a Seltzer és munkatársai (1990) által kidolgozott neuropátiás mechanikai allodynia-modellt alkalmaztuk. Ennek során Randall–Selitto készülékkel (Analgesimeter, Ugo Basile, Olaszország) mértük meg patkányok bal hátsó lábán a grammal mért mechanonociceptív küszöböt. Habitációs céllal két mérés történt, amelyeknek eredményeit nem használtuk fel. Ezt követően újabb 2 mérés következett 10 perces időközzel, és e két érték átlaga szolgáltatta a kiindulási mechanonociceptív küszöböt (preoperatív kontroll). Ezt követően pentobarbital-narkózisban (50 mg/kg i.p.) feltártuk a n. ischiadicust a comb felső részének magasságában, majd atraumatikus 6-0 fonállal lekötöttük az ideg kb. egyharmadát. Ezután a sebet zártuk. Két nappal később egy újabb narkózis során ezek az állatok is átesetek a fentiekben leírt, jobb lábon elvégzett idegátmetszésen. 18 órával az idegátmetszés után újra megmértük a bal hátsó láb mechanonociceptív küszöbét, és ezt tekintettük a posztoperatív kontroll értéknek. Az ellenoldali (jobb) láb kapszaicinnel, illetve mustárolajjal (vagy ezek szolvensével) történő kezelését követően a részleges ideglekötésen átesett (bal) lábon 20 és 40 perc elteltével mértük meg a mechanonociceptív küszöböt.

A plazma szomatosztatinszerű immunreaktivitásának meghatározása

18 órával (szubakut idegátmetszés) vagy 5 nappal (krónikus denerváció) a jobb hátsó végtagon elvégzett idegátmetszés (és 18 órával a bal hátsó láb talpán végzett bemetszés) után az állatokat újra elaltattuk pentobarbitállal, majd az idegátmetszett jobb hátsó lábba 100 µg kapszaicint vagy annak szolvensét adtunk intraplantárisan. Tíz és 20 (krónikus denerváció esetén csak 10) perccel később szívpunkció révén vérmintát (kb. 3 ml) nyertünk, amelyet jéghideg, aprotinint (Trasyolol, 200 NE) és EDTA-t (2 mg/ml) tartalmazó csőbe helyeztünk, majd 4 °C-on lecentrifugáltunk (1000-es fordulatszámon 5 percig, majd 4000-esen 15 percig). A nyert plazmából „radioimmunoassay” segítségével határoztuk meg a szomatosztatinszerű immunreaktivitást az intézetünkben korábban kidolgozott módszerrel (Németh *et al.*, 1996). A szomatosztatinszerű immunreaktivitás változását százalékos formában adtuk meg az alábbi formula szerint: $(\text{átlagérték kapszaicinstimulációval} - \text{átlagérték szolvensstimulációval}) / \text{átlagérték szolvensstimulációval} \times 100$.

A nociceptív hőküszöb mérése egér farkán, illetve a hátsó láb talpi részén

Az egér farkán a nociceptív hőküszöböt az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mértük, állattartó hengerek alkalmazásával (lásd 4.9.2. pont). Az egér hátsó lábának talpi részén a nociceptív hőküszöböt emelkedő hőmérsékletű forró lappal (IITC Life Science, Woodland Hills, USA) mértük. Az egeret az eszköz melegíthető fémlapjára helyezett plexi megfigyelő kamrába tettük, ahol szabadon mozoghatott. A fémlap hőmérsékletét 30 °C-os kiindulási hőmérsékletről 12 °C/perc sebességgel növeltük mindaddig, amíg az állat valamilyen nocifenzív reakciót (típusosan valamilyen hátsó láb emelése, rázása, megnyalása) nem mutatott. Ekkor a fűtést megszakítottuk, és a készülék által kijelzett laphőmérsékletet tekintettük az érintett talp nociceptív hőküszöbének. A „cut-off” hőmérséklet 53 °C volt.

A nociceptív hidegérzékenység vizsgálata az egér farkán

Ezeknél a kísérleteknél is a fentiekben leírt állattartó hengereket alkalmaztuk. Segítségükkel az egér farkát jeges, azaz 0 °C-os vizet tartalmazó tartályba mártottuk, és a típusos nocifenzív reakció (a fark erőteljes rázása) bekövetkeztéig eltelt időt mértük. A „cut-off” idő 180 s volt.

A mechanonociceptív küszöb meghatározása egér hátsó lábának talpi részén

A hátsó láb talpán a mechanonociceptív küszöböt dinamikus plantáris eszteziométerrel (Ugo Basile Aesthesiometer 37400, Olaszország) mértük. Az egerek szabadon mozogtak a

készülék részét képező fémhálón, amelyen keresztül alulról egy egyenes fémszálat irányított a talpra a készülék egyenletesen növekvő intenzitással (2 g/s) mindaddig, amíg az állat el nem húzta a lábát. A kijelzőn megjelenő aktuális – grammal kifejezett – nyomóerőt tekintettük a láb mechanonociceptív küszöbének. A „cut-off” érték 10 g volt. Három egymás utáni mérés átlagát tekintettük a kiindulási mechanonociceptív küszöbnek.

Az AITC-vel kiváltott termális allodynia vizsgálata az egér farkán, illetve hátsó lábának talpi részén

30% DMSO-ban oldott 1%-os AITC hatását vizsgáltuk a fark, illetve a talp nociceptív hőküszöbére emelkedő hőmérsékletű vízfürdőt, illetve forró lapot alkalmazva. Az AITC vehikulumát és koncentrációját előkísérletekben határoztuk meg (lásd 4.9.3. pont). A kiindulási (alap) hőküszöb mérése után az egér farkát vagy egyik hátsó lábát 1%-os AITC oldatba mártottuk 30, illetve 60 másodpercre (mivel a talp esetében a 30 s expozíciós idővel nyert adatok nem voltak konzisztensek, a koncentráció emelése helyett a behatás időtartamát növeltük meg). Ezután 10 percenként mértük a nociceptív hőküszöböt 1 órán keresztül az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel, illetve forró lappal a küszöbcsökkentő hatás, azaz a termális allodynia kimutatása céljából.

Az AITC-vel kiváltott mechanikai allodynia vizsgálata az egér hátsó lábának talpi részén

A kontroll mechanonociceptív küszöb mérése után az egér hátsó lábát 1%-os, 30% DMSO-t tartalmazó AITC oldatba mártottuk 60 másodpercre. 30, 60, 120 és 180 perccel később ismételten meghatároztuk a mechanonociceptív küszöböt. A mechanikai allodyniaként értelmezett küszöbcsökkenést a kiindulási küszöb százalékában adtuk meg.

Az AITC-vel kiváltott nocifenzív reakció vizsgálata az egér farkán

Az egér farkát 1%-os, 30% DMSO-t tartalmazó AITC oldatba mártottuk mindaddig, amíg a típusos nocifenzív reakció (a fark erőteljes rázása) be nem következett, és az addig eltelt időt mértük. A „cut-off” idő 180 s volt. A nocifenzív reakció után az állat farkát kiemeltük az AITC-oldatból és szárazra töröltük, lehetőség szerint eltávolítva az irritáns anyagot.

A TRPV1-receptor-agonisták idegvégződés-szintű deszenzibilizáló hatásának vizsgálata

Mindkét hátsó láb kiindulási (kontroll) hőküszöbének mérése („incremental hot/cold plate analgesia meter” segítségével) után az állatok mindkét hátsó lábába kapszaicint, RTX-et vagy OLDA-t, illetve annak szolvensét adtunk intraplantáris injekció (100 µl) formájában, majd

naponként megismételtük a hőküszöbmérést az elsőként reagáló hátsó lábra vonatkozóan. Ha elértük a „cut-off” értéket, az állatot eltávolítottuk a lapról, és 50 °C-nak vettük a küszöböt. A kétoldali kezelésre azért volt szükség, hogy elkerüljük a nem kezelt, intakt hőérzékenységű lábának égési sérülését, amely abból származott volna, hogy a szer hosszútávú hatásként megemeli a hőküszöböt. Egy külön kísérletsorozatban a nociceptív forró és hideg küszöböt párhuzamosan mértük naponként ugyanabban az állatcsoportban kapszaicin vagy RTX bilaterális intraplantáris injekciója előtt és után naponta.

A TRPV1-receptor-agonisták TRPV1-re korlátozódó deszenzibilizáló hatásának vizsgálata

Ezekben a kísérletekben az egyik hátsó végtagba intraplantárisan adott TRPV1-receptor-agonisták (RTX, OLDA) által kiváltott akut nociceptív válaszokat hasonlítottuk össze az első és második expozíció során: a nocifenzív reakció (láb nyalása, emelése) időtartamát, illetve a beadás után 5 (RTX) vagy 10 perc (OLDA) múlva a nociceptív hőküszöb csökkenését mértük („incremental hot/cold plate analgesia meter” segítségével). Ebben a sorozatban a kapszaicint nem vizsgáltuk konzisztens hőküszöbcsökkentő hatásának hiánya miatt. Az RTX esetében a kontroll hőküszöb meghatározása után a szert intraplantárisan adtuk (0,016 nmól), majd lemértük a nocifenzív válasz időtartamát és annak elmúta után az 5. percben a hőküszöböt. 3 órával később megmértük a hőküszöböt, majd az RTX (0,016 nmól) adását az előzőleg kezelt lábba megismételtük. Ekkor lemértük a nocifenzív válasz időtartamát és annak elmúta után az 5. percben a hőküszöböt. Ugyanezen RTX-előkezelés (0,016 nmól, 3 óra) hatását megvizsgáltuk az 1%-os formalin intraplantáris injekciójával kiváltott nocifenzív reakció időtartamára is az RTX szolvensével összehasonlítva. Az OLDA esetében a kontroll hőküszöb meghatározása után az állatcsoport fele 250 nmól OLDA-t kapott intraplantárisan (50 µl), a másik fele ennek szolvensét. 3 óra múlva mindkét csoportban megmértük a hőküszöböt, majd az OLDA kisebb dózisa (5 nmól) által kiváltott nocifenzív reakció időtartamát, és annak elmúta után az 10. percben a hőküszöböt határoztuk meg. Az OLDA-, illetve annak szolvensével történő 3 órás előkezelés hatását az RTX által kiváltott válaszokkal kapcsolatban is megvizsgáltuk a két szer közti kereszt-deszenzibilizáció kimutatása céljából.

Anyagok

A HOE 140, a [dez-Arg¹⁰]-HOE 140, a „nordihydroguaiaretic acid” (NDGA), az N(G)-nitro-l-arginin (L-NOARG) és a trinitrofenil-ATP (TNP-ATP) beszerzése a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) cégtől történt. Az AMG9810 és az SB-366791 a Tocris Bioscience-től (Bristol, UK) származott. A HOE 140, [dez-Arg¹⁰]-HOE 140, a TNP-ATP és az L-NOARG

oldása fiziológias sóoldatban történt. Az NDGA, AMG9810 és SB-366791 törzsoldatai (rendre 10, 50 and 100 mM) DMSO-val készültek, és fiziológias sóoldattal lettek hígítva.

A zsírsavamidos kísérletekben mind a kapszaicint (Sigma, St. Louis, MO, USA), mind az OLDA-t (Tocris Cookson Ltd, UK) 10% etanolban, 10% Tween 80-ban és 80% fiziológias sóoldatban oldottuk fel 10 mM-os törzsoldatként. A 3-MOLDA és 4-MOLDA (MTA Kémiai Kutatóintézete), valamint az OEA (Sigma, St. Louis, MO, USA) és RTX (Sigma, St. Louis, MO, USA) törzsoldatát DMSO-val készítettük. Az I-RTX-et (Sigma, St. Louis, MO, USA) etanolban oldottuk 1 mg/ml-es törzsoldatot készítve. A törzsoldatok hígítása fiziológias sóoldattal történt.

Az egyéb kísérletekben kapszaicinből 1%-os, az OLDA-ból 0,5%-os törzsoldatot készítettünk 10% Tween 80, 10% etanol (96%) és 80 % fiziológias sóoldat felhasználásával. Az RTX-et (Sigma, St. Louis, MO, USA) etanolban oldottuk fel 1 mg/ml-es törzsoldatot képezve. A magas koncentrációjú (50 mM) KCl-oldat előállításához 50 mM NaCl-ot ekvimoláris KCl-ra cseréltünk az extracelluláris folyadékban. A KT5720 (Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel), a forskolin (Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel) és a forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA, Sigma, St. Louis, MO, USA) feloldása DMSO-ban történt. A törzsoldatok (rendre 50 µg/ml, 1 mg/ml, 5 mg/ml) hígítását extracelluláris oldattal végeztük. A staurosporin (Alomone Laboratories, Jerusalem, Israel) 100 µg/ml-es törzsoldatát etanollal készítettük, a chelerythrin-kloridét (Alomone Laboratories) and dibutiril-cAMP-ét (dbcAMP, Sigma, St. Louis, MO, USA) desztillált vízzel, mindkettőnél 5 mg/ml-es koncentrációban. A törzsoldatok hígítása extracelluláris oldattal vagy fiziológias sóoldattal történt.

A pentobarbital-Na (CEVA Kft., Budapest, Magyarország) feloldása fiziológias sóoldattal történt. A mustárolajat (Merck, Darmstadt, Németország) paraffinolajban oldottuk fel. A szomatosztatint, cikloszomatosztatint és a naloxon-hidroklorid-dihidrátot (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) fiziológias sóoldatban oldottuk fel. Az indocianinzöld a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, USA), a ketamin-hidroklorid a Richter Gedeon NyRT-től (Budapest, Magyarország), a xylazin-hidroklorid az Eurovet Animal Health-től (Bladel, Hollandia) került beszerzésre.

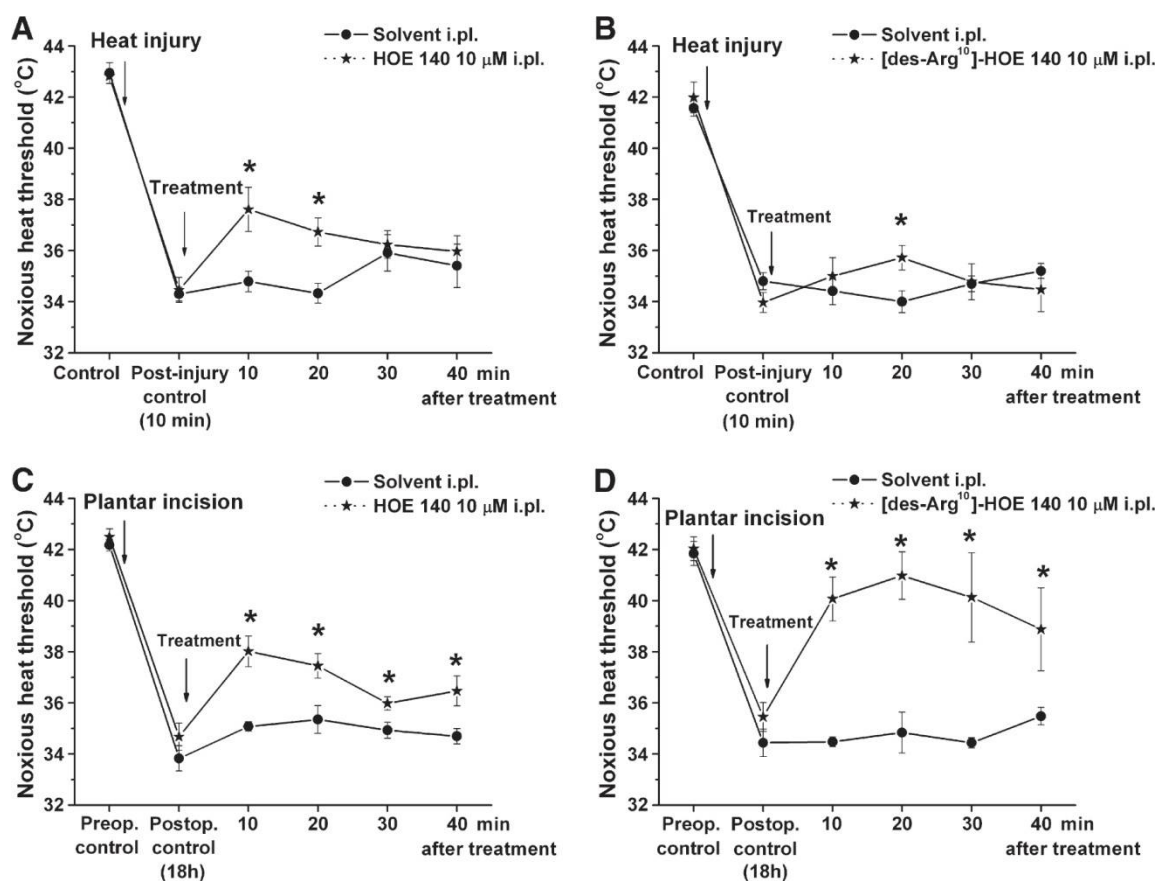
5.2. Az enyhe hőtraumával és a plantáris bemetszéssel kiváltott termális allodynia mediátorainak összehasonlító vizsgálata

5.2.1. Előzmények és célkitűzés

Az enyhe hőtraumával és a sebészi bemetszéssel kiváltott termális hiperalgéria két olyan fájdalommodell, amelyek közvetlen klinikai relevanciával bírnak az égési sérüléssel kapcsolatos, illetve a posztoperatív fájdalom vonatkozásában. A két paradigma között jelentős különbség áll fenn az időbeli lefutás tekintetében: a hőtraumával keltett hőhiperalgériát gyors kezdet és rövid hatástartam jellemzi (Hardy *et al.*, 1950; Meyer és Campbell, 1981; LaMotte *et al.*, 1982; Coderre és Melzack, 1987; Nozaki-Taguchi és Yaksh, 1998; 4.4.3. pont), míg az incízió esetében a hővel szembeni fokozott válaszkészség lassabban alakul ki, de jóval tartósabb (Zahn és Brennan, 1999; 4.5.3. pont). Az incízió esetében valószínűsíthetően idegkárosodással is kell számolni. Hangsúlyozandó, hogy vizsgálatunk idején viszonylag kevés adat állt rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy milyen mediátorok, receptorok, illetve ioncsatornák közvetítik a termális hiperalgériát ebben a két modellben (a részleteket lásd az Eredmények és megbeszélés pontban). Az emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel jó időbeli felbontással tudtuk kimutatni a termális válaszkészség fokozódását mindkét modellben, és a konvencionális analgetikumok alacsony dózisainak a hatását tudtuk detektálni (lásd 4.4.3. és 4.5.3. pont). Mindez azt mutatja, hogy a nociceptív hőküszöb mérése alkalmas metodikai megközelítés ebben a két paradigmában. Célunk az volt, hogy az enyhe hőtraumával, illetve sebészi bemetszéssel kiváltott termális allodynia perifériás mediátorhátterét intraplantárisan adott tesztanyagok segítségével összehasonlítsuk.

5.2.2. Eredmények és megbeszélés

Amíg az incíziónál mind a noxa, mind a kezelés csak a plantáris felszínre korlátozódott, a hőtrauma esetében a noxa a hátsó láb talpi és lábháti részét egyaránt érte, de a tesztvegyületek adása csak a plantáris felszínt érintette. Ez a tény egyfajta szisztematikus hibát eredményezett, ami miatt a tesztagens hatékonyságát a paradigma alábecsülte. Ez indokolta, hogy a két modellben nyert százalékos gátlási értékeket nem hasonlítottuk össze. A B₂-bradikininreceptor-antagonista HOE140 (icatibant) mind a hőtrauma, mind a bemetszés által kiváltott hőküszöbcsökkenést szignifikánsan gátolta a szolvenséhez képest (**51. ábra, A és C panel; 9. táblázat**). Ezzel szemben a B₁-bradikininreceptor-antagonista [dez-Arg¹⁰]-HOE 140 csak az incíziós modellben volt egyértelműen hatékony, a hőtrauma hatását csak a 20. percben gátolta



51. ábra. Intraplantárisan adott bradikininreceptor-antagonista szerek (B_2 -receptor-antagonista HOE 140, **A** és **C** panel; B_1 -receptor-antagonista [des-Arg¹⁰]-HOE 140, **B** és **D** panel) hatása az enyhe hőtraumával (**A** és **B** panel) vagy plantáris incízióval (**C** és **D** panel) kiváltott hőküszöbcsökkenésre. A hőküszöbcsökkentő noxa és a kezelés (szolvens vagy szer) idejét nyíl jelzi. Az adatok átlag \pm SEM értékek ($n=12$). A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p<0,05$) eltérő értéket jelölnek a szolvenssel történt kezeléshez viszonyítva (kétszemponstos ANOVA-t követő Newman–Keuls-teszt).

9. táblázat. Az intraplantárisan alkalmazott tesztanyagok hatása az enyhe hőtraumával vagy plantáris incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenésre.

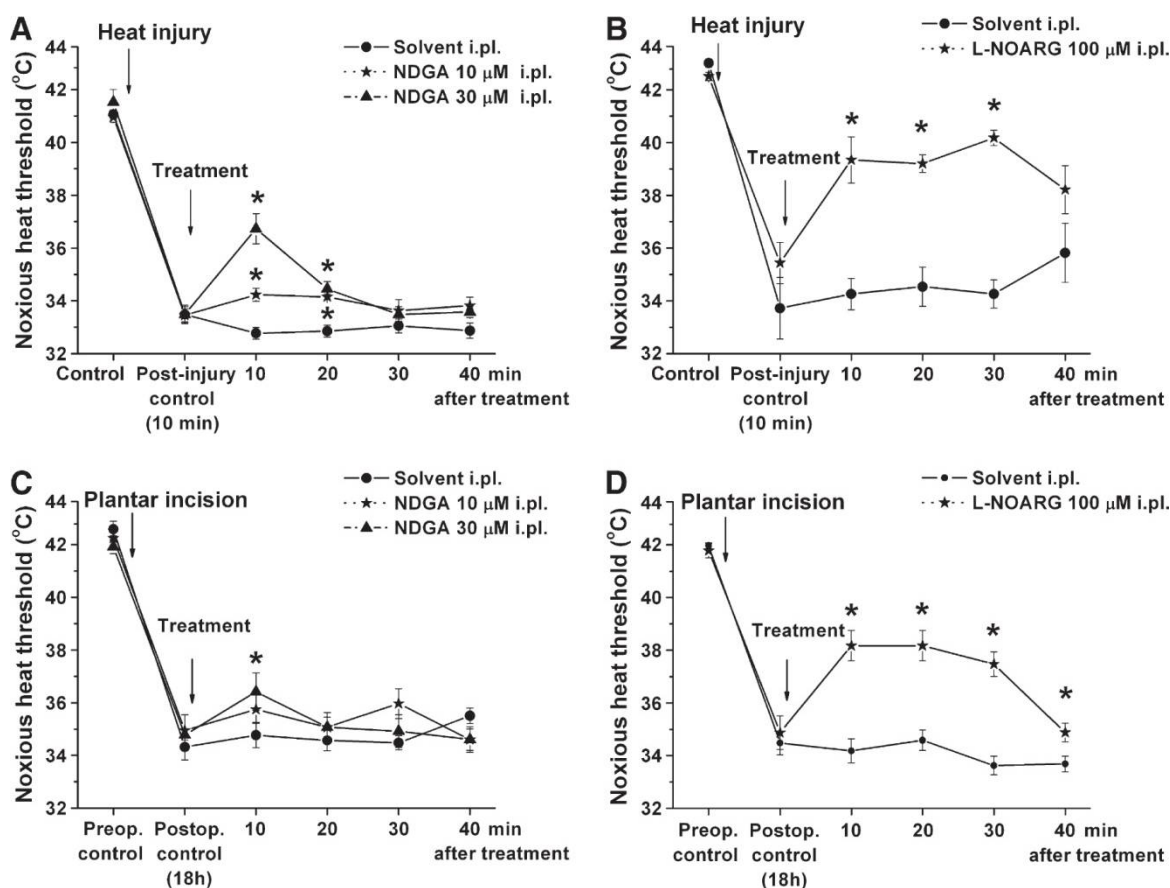
Drug	Concentration	Heat injury		Plantar incision	
		Overall effect P value	Percentage inhibition	Overall effect P value	Percentage inhibition
HOE 140	10 μ M	<0.05	32.6%	<0.05	31.6%
[des-Arg ¹⁰]-HOE 140	10 μ M	NS	10.0%	<0.01	79.0%
NDGA	10 μ M	<0.001	18.0%	NS	13.6%
	30 μ M	<0.05	28.0%	NS	17.9%
L-NOARG	100 μ M	<0.001	62.4%	<0.01	52.4%
TNP-ATP	0.3 μ M	<0.05	61.6%	<0.05	54.5%
AMG9810	1 μ M	0.073	25.8%	–	–
	10 μ M	<0.05	48.2%	–	–
SB-366791	10 μ M	–	–	NS	6.1%
	100 μ M	–	–	<0.05	46.9%

A szerek hatását statisztikailag a 10. és 20. percben mért küszöbcsökkenés összege alapján ítéltük meg a Student-féle kétmintás t-próba segítségével. A szerek hőküszöbcsökkenést gátló hatását százalékban adtuk meg a 4.2. pontban említett képlet segítségével. NS: statisztikailag nem szignifikáns.

(51. ábra, **B** és **D** panel), ami miatt az összegátlás mértéke nem érte el a szignifikancia szintjét (**9. táblázat**). A B_2 és B_1 -receptorok szerepe az incíziós modellben lényeges eredmény, mivel egy

korábbi vizsgálat (Leonard *et al.*, 2004) – latenciamérést alkalmazva a plantártesztben – egyik receptor-altípus szerepét sem tudta kimutatni 24 órával a bemetszés után. A bradikinin involváltsága nem meglepő, hiszen a szöveti trauma képes aktiválni a kallikrein–kinin rendszert. Mint ismeretes, a B₂-receptorok konstitutívan kifejeződnek a nociceptív idegvégződéseken, míg a B₁-receptorok indukálhatók (lásd Hall 1997; Marceau és Bachvarov 1998; Marceau *et al.* 1998); valószínűleg a 18 órás időtartam elegendő volt utóbbiak számottevő kifejeződéséhez. A hőtrauma esetében csak a B₂-receptorok szerepét sikerült kimutatni, ami nem meglepő, hiszen ebben a paradigmában a noxa utáni 20–50. percben történt a mérés, amikor még számottevő B₁-receptor-kifejeződés nem várható. A B₁-bradikininreceptor szerepe 18 órával az incízió után – de nem 20–50 perccel a hőtraumát követően – megerősíti azt a nézetet, hogy a B₁-receptor-antagonisták tesztelésére a szubakut/krónikus modellek alkalmasabbak, mint az akutak. Ennek megfelelően célszerű lenne a fájdalomcsillapítók klinikai vizsgálata során olyan teszteket is alkalmazni, amelyek elhúzódóbbak, mint a rutin módszerként alkalmazott 3. moláris fog eltávolítása utáni fájdalom.

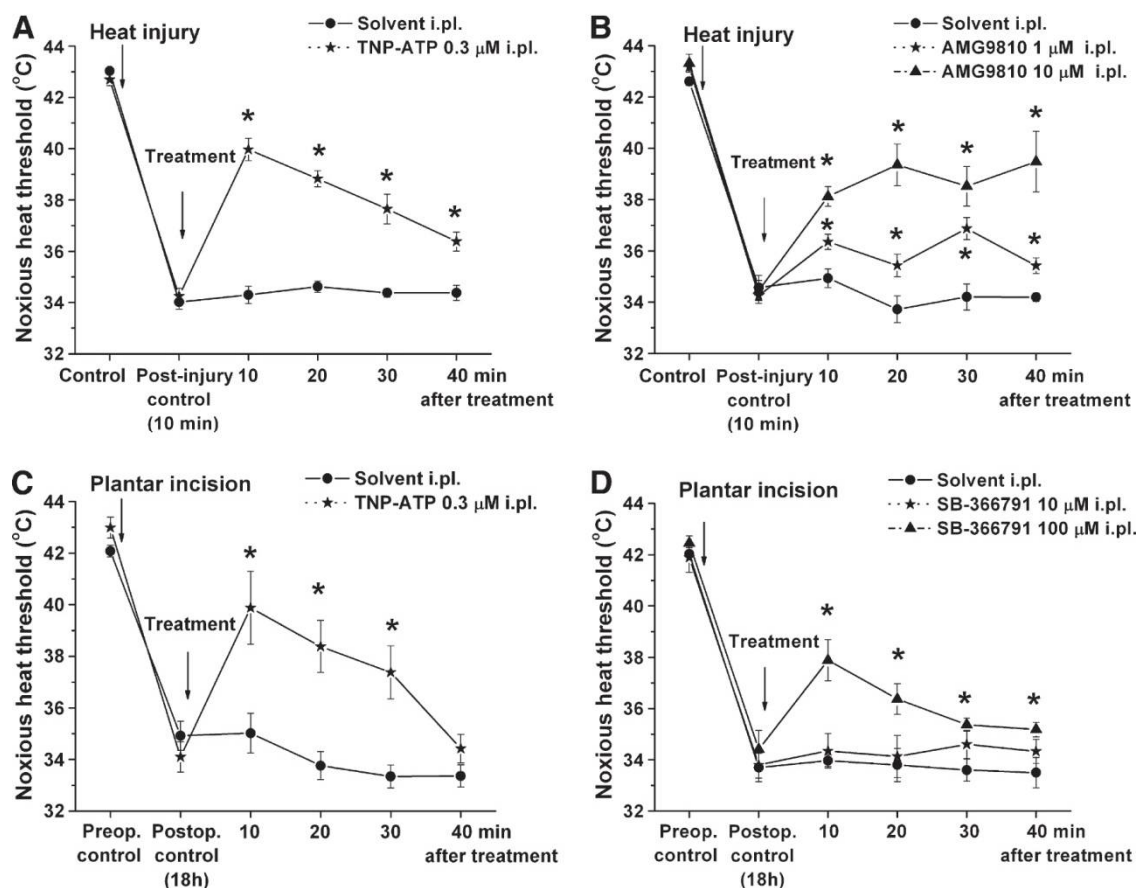
Előző vizsgálatainkban, amelyekben validáltuk a két modellt, kimutattuk, hogy az intraplantárisan adott COX-gátlók mérsékeltek a hőtraumával vagy plantáris bemetszéssel kiváltott hőküszöbcsökkenést lásd (4.4.3. és 4.5.3. pont), igazolva a COX-termékek (prosztanoidok) közvetítő szerepét. A prosztanoidok, különösen a PGE₂ és PGI₂ típusos nociceptor-szenzibilizáló ágensek (a részleteket illetően lásd Pethő és Reeh, 2012). A jelen vizsgálatainkban a lokálisan adott nem-szelektív lipoxigenáz-gátló NDGA csak a hőtrauma hatását gátolta (**52. ábra, A és C panel; 9. táblázat**), jelezve hogy a lipoxigenáz-termékek csak ebben a modellben játszanak szerepet. Minthogy nem-szelektív gátlót alkalmaztunk, nem állapítható meg, hogy leukotriének és/vagy egyéb lipoxigenáz-termékek felelősek a hatásért. Mind az LTB₄, mind ciszteinil-leukotriének (LTC₄, LTD₄) nociceptor-szenzibilizáló képessége jól ismert (a részleteket illetően lásd Pethő és Reeh, 2012). A nitrogén-monoxid-szintáz (NOS) nem-szelektív gátlója, az L-NOARG mindkét modellben gátolta a hőküszöbcsökkenést, jelezve az NO közvetítő szerepét (**52. ábra, B és D panel; 9. táblázat**). Tekintettel arra, hogy az L-NOARG mindhárom NOS-izofórmát gátolja, az érintett izoenzim(ek) nem azonosítható(k) a jelen adatok alapján. Az NO kétarcú ágens a nocicepció szempontjából: perifériás pronociceptív és antinociceptív hatásai egyaránt ismeretesek (a részleteket illetően lásd Pethő és Reeh, 2012).



52. ábra. A nem-szelektív lipoxigenáz-gátló NDGA (A és C panel) és a nem-szelektív nitrogénmonoxidszintáz-gátló L-NOARG (B és D panel) hatása az enyhe hőtraumával (A és B panel) vagy plantáris incízióval (C és D panel) kiváltott hőküszöbcsökkenésre. A hőküszöbcsökkentő noxa és az intraplantáris kezelés (szolvens vagy szer) idejét nyíl jelzi. Az adatok átlag \pm SEM értékek (n=12). A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérő értéket jelölnek a szolvenssel történt kezeléshez viszonyítva (kétszemponos ANOVA-t követő Newman-Keuls-teszt).

A P2X purinoceptorok szerepét is mindkét modellben igazolni tudtuk a szelektív antagonistá TNP-ATP alkalmazásával (53. ábra, A és C panel; 9. táblázat). Ezzel összhangban a TNP-ATP gátolta a formalinteszt második fázisát patkányban, hasonlóan a P2X₃-génhiányos egérhez (Jarvis *et al.*, 2001; Cockayne *et al.*, 2000; Souslova *et al.*, 2000). Említésre méltó még, hogy magas ATP-szintet találtak tengerimalac bőrben hőtraumát követően (Carney *et al.*, 1976). Végezetül a TRPV1-receptor közvetítő szerepére is találtunk bizonyítékot két szelektív antagonistá alkalmazásával: az AMG9810 a hőtrauma, míg az SB366791 az incízió esetében gátolta a hőküszöbcsökkenést (53. ábra, B és D panel; 9. táblázat). A TRPV1 szerepét e két modellben saját párhuzamos vizsgálataink direkt módon megerősítették szisztémásan adott antagonistákkal (4.6. pont). A TRPV1 mediátor szerepe a hőtraumával, illetve bemetszéssel kiváltott termális allodyniában egyáltalán nem meglepő, hiszen számos termális hiperalgéria/allodynia modellben a TRPV1 jelentős, közel 100%-os mediátor szerepét igazolták a talpon (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2003; Pomonis *et al.*, 2003;

Gavva *et al.*, 2005; Honore *et al.*, 2005; Bölcskei *et al.*, 2005; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008; Banik és Brennan 2009). Az is figyelemreméltó, hogy a TRPV1 aktiválható protonokkal, és az incindált talpi szövetben a pH csökkenését mutatták ki (Woo *et al.*, 2004).



53. ábra. A P2X-purinoreceptor-antagonista TNP-ATP (A és C panel) és a TRPV1-receptor-antagonista AMG9810, illetve SB 366791 (B és D panel) hatása az enyhe hőtraumával (A és B panel) vagy plantáris incízióval (C és D panel) kiváltott hőküszöbcsökkenésre. A hőküszöbcsökkentő noxa és az intraplantáris kezelés (szolvens vagy szer) idejét nyíl jelzi. Az adatok átlag \pm SEM értékek (n=12). A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérő értéket jelölnek a szolvenssel történt kezeléshez viszonyítva (kétszemponos ANOVA-t követő Newman–Keuls-teszt).

Érdekes és lényeges eredmény, hogy az egyes antagonistákkal, illetve enzimgátlókkal nyert gátlási százalékok összege meghaladja a 100-at (9. táblázat). Ez azt valószínűsíti, hogy e két allodynia-modellben a mediátorok nem egymástól függetlenül, párhuzamosan hatnak, hanem közöttük interakció, pontosabban közös célstruktúra(ko)n való konvergencia áll fenn, és ez annak aktivációját egy limitált maximális értékre állítja be, azaz szaturáció következik be. Egy ilyen lehetséges konvergenciapont a TRPV1-receptor, amelyről ismert, hogy „molekuláris integrátorként” számos endogén ágens (proton, bradikinin, prosztaglandinok, lipoxigenáz-termékek) hatásainak a közvetítésében részt vesz (lásd 1.4.1.1. pont). Modelljeink szempontjából

releváns, hogy a bradikininről és a PGE₂-ről kimutatták, hogy képes szenzibilizálni a TRPV1-et hővel szemben PKC, illetve PKA-közvetítette foszforiláció révén (Sugiura *et al.*, 2002; Moriyama *et al.*, 2005). Az is ismert, hogy bizonyos lipoxigenáz-termékek közvetlenül aktiválják a TRPV1-et (Hwang *et al.*, 2000), és az NO is képes erre a TRPV1 bizonyos cisztein-aminosavainak S-nitrozilációja révén (Yoshida *et al.*, 2006).

5.2.3. Fontosabb következtetések

- 1./ Viszonylag kis különbségeket sikerült kimutatni az enyhe hőtraumával kiváltott akut, illetve a plantáris bemetszéssel keltett szubakut/krónikus termális allodynia perifériás mediátorháttere között.
- 2./ A B₂-bradikininreceptor, P2X-purinoceptor(ok) és a TRPV1-receptor, valamint prosztanoidok és az NO szerepét mindkét modellben igazoltuk.
- 3./ A hőtrauma esetében lipoxigenáz-termékek, az incíziónál a B₁-bradikininreceptor járulékos szerepére derült fény.
- 4./ A feltárt receptorok és mediátorok potenciális támadáspontot jelentenek, új típusú, perifériás támadáspontú analgetikumok fejlesztéséhez.

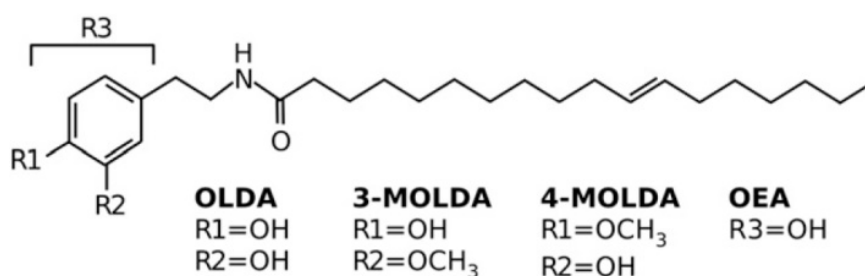
5.3. A TRPV1-csatornán ható zsírsavamidok vizsgálata *in vitro* és *in vivo*

5.3.1. Előzmények és célkitűzés

A kapszaicin, RTX, forró ingerek, protonok mellett a TRPV1-receptor korán azonosított agonistái közé tartozik az endogén kannabinoidok egyik zsírsavamid jellegű képviselője, az *N*-arachidonil-etanolamid, más néven anandamid (Pertwee, 2001; Zygmunt *et al.*, 1999; Smart *et al.*, 2000). Ezen ágens azonban csak jóval magasabb koncentrációban aktiválja a TRPV1-et, mint amely az antinociceptív hatásokat közvetítő kannabinoid CB₁-receptor stimulációjához szükséges, megkérdőjelezve azt a nézetet, hogy az anandamid lenne a TRPV1-receptor endogén liganduma (a részleteket illetően lásd Szolcsányi, 2000; Di Marzo *et al.*, 2001). Ezzel szemben egy később izolált, szintén zsírsavamid karakterű endokannabinoid, az *N*-oleoil-dopamin (OLDA) esetében fordított a helyzet: 50-szer alacsonyabb koncentrációban képes aktiválni a humán TRPV1-et, mint a patkány CB₁-receptorát, ezenkívül *in vivo* termális hiperalgéziát okoz (Chu *et al.*, 2003). Mindezek alapján felmerült annak lehetősége, hogy az OLDA lehet a TRPV1-receptor endogén liganduma. Egy másik zsírsavamid, az *N*-oleoil-etanolamid (OEA) TRPV1-aktiváló képességét több *in vitro* és *in vivo* vizsgálatban is kimutatták (Ahern, 2003; Wang *et al.*,

2005; LoVerme *et al.*, 2006), de ennek ellentmondóan mind zsigeri, mind gyulladásos fájdalommodellben antinociceptív hatásának találták (Suardiaz *et al.*, 2007).

A fentiek alapján célunk az volt, hogy a nociceptív primer afferens neuronok sejttestén végzett *in vitro* és a perifériás nociceptorok működésének analízisén alapuló *in vivo* módszerek alkalmazásával megvizsgáljuk az OLDA-nak, két újonnan szintetizált származékának, a 3-metil-*N*-oleoil-dopaminnak (3-MOLDA), illetve a 4-metil-*N*-oleoil-dopaminnak (4-MOLDA), valamint az OEA-nak (54. ábra) a TRPV1-receptorra kifejtett hatását. Ezenkívül az anandamid vizsgálatára is sor került, de csak az *in vivo* modellben, mivel ezen ágenszt korábban részletesen vizsgálták *in vitro* módszerekkel.

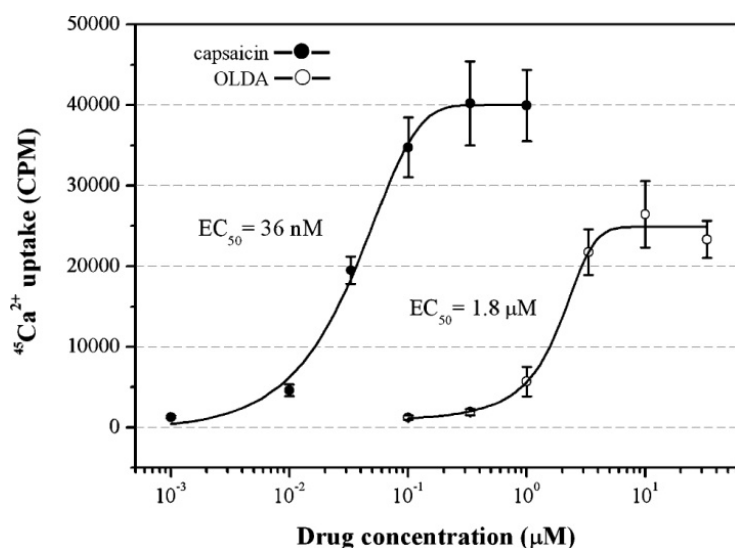


54. ábra. Az *N*-oleoil-dopamin (OLDA), 3-metil-*N*-oleoil-dopamin (3-MOLDA), 4-metil-*N*-oleoil-dopamin (4-MOLDA) és az *N*-oleoil-etanolamid (OEA) szerkezeti képlete.

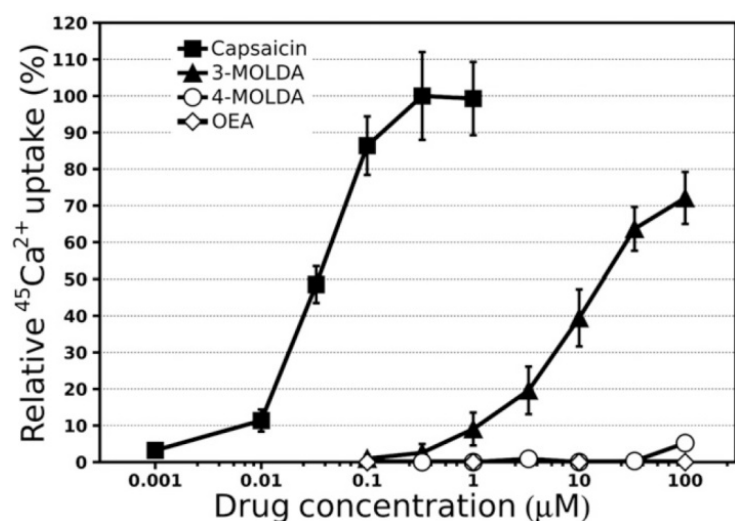
5.3.2. Eredmények

A zsírsavamidok hatása TRPV1-receptorral transzfektált HT5-1 sejtek ⁴⁵Ca²⁺-felvételére

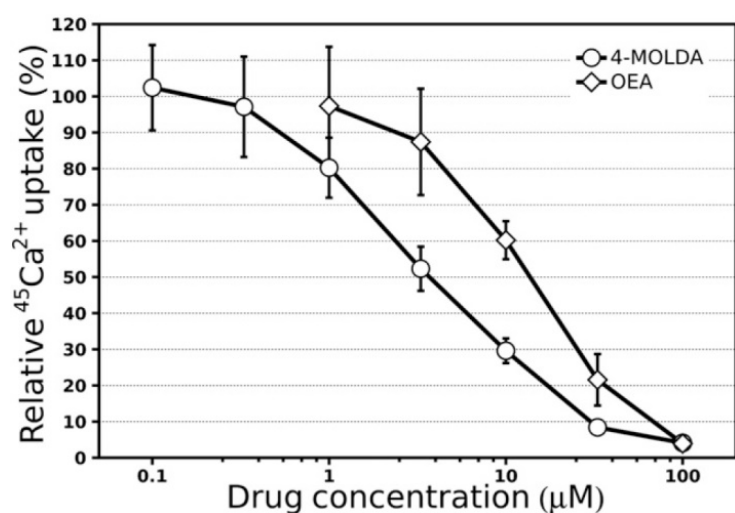
Mind a referencia TRPV1-agonistaként használt kapszaicin, mind az OLDA ⁴⁵Ca²⁺-akkumulációt váltott ki HT5-1 sejtekben (55. ábra). Az OLDA által kiváltott maximális válasz 60%-a volt a kapszaicinének, és az EC₅₀-értéke 50-szer nagyobb volt, mint a kapszaiciné. Tehát az OLDA-ának mind a hatékonysága, mind a hatáserőssége kisebb, mint a kapszaiciné. Megjegyzendő, hogy humán TRPV1-gyel transzfektált HEK293-sejteken az OLDA és a kapszaicin ekvipotensnek mutatkozott (Chu *et al.*, 2003), jelezve a különféle fajok TRPV1-receptorának különbözőségét. A 3-MOLDA a kapszaicinhez hasonlóan ⁴⁵Ca²⁺-akkumulációt váltott ki a TRPV1-gyel transzfektált HT5-1 sejtekben (56. ábra). A hatékonysága a kapszaicinhez képest 70% volt, míg az EC₅₀-értéke 20 μM volt, ami kapszaicin 36 nM-os értékéhez viszonyítva több mint 500-szor kisebb hatáserősséget jelez. A 4-MOLDA és az OEA nem váltott ki ⁴⁵Ca²⁺-akkumulációt. Ebből adódóan célszerűnek láttuk e két ágens esetleges TRPV1-antagonista hatásának vizsgálatát. Mindkét szer (külön vizsgálva) koncentrációfüggő módon csökkentette a 100 nM kapszaicinnal kiváltott ⁴⁵Ca²⁺-akkumulációt (57. ábra), ami azt jelzi, hogy e két vegyület TRPV1-antagonista hatással bír. A 4-MOLDA IC₅₀-értéke 3,8±1,0 μM volt, a OEA-é 16,3±3,5 μM, jelezve, hogy a 4-MOLDA TRPV1 iránti affinitása nagyobb.



55. ábra. Koncentráció-hatás görbe a kapszaicin és az *N*-oleoildopamin (OLDA) által kiváltott radioaktív $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételre patkány TRPV1-gyel transzfektált HT5-1 sejtekben. Az adatok átlag \pm SEM (n=4 mindkét szer esetében). CPM: percenkénti beütésszám.



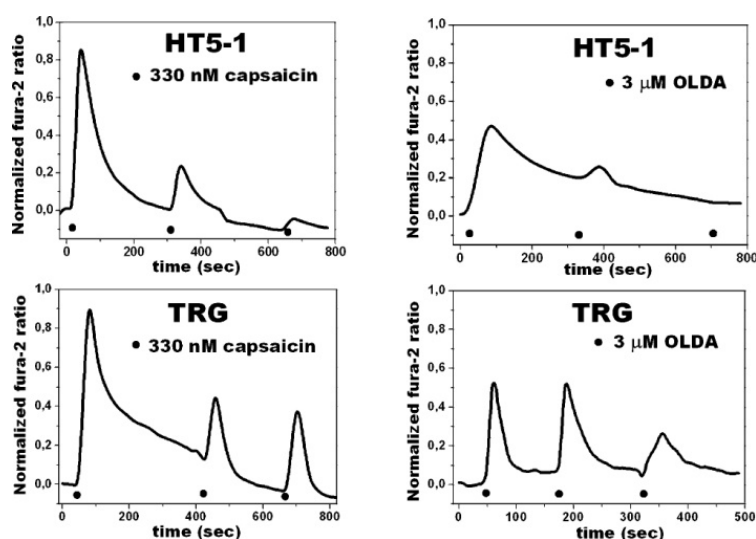
56. ábra. Koncentráció-hatás görbe a kapszaicin, 3-metil-*N*-oleoildopamin (3-MOLDA), 4-metil-*N*-oleoildopamin (4-MOLDA) és az *N*-oleoiletanolamid (OEA) által kiváltott radioaktív $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételre patkány TRPV1-gyel transzfektált HT5-1 sejtekben. Az adatok a 330 nM kapszaicinnal kiváltott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvétel százalékában kifejezett értékek átlag \pm SEM formában (n=4 mindegyik szer esetében).



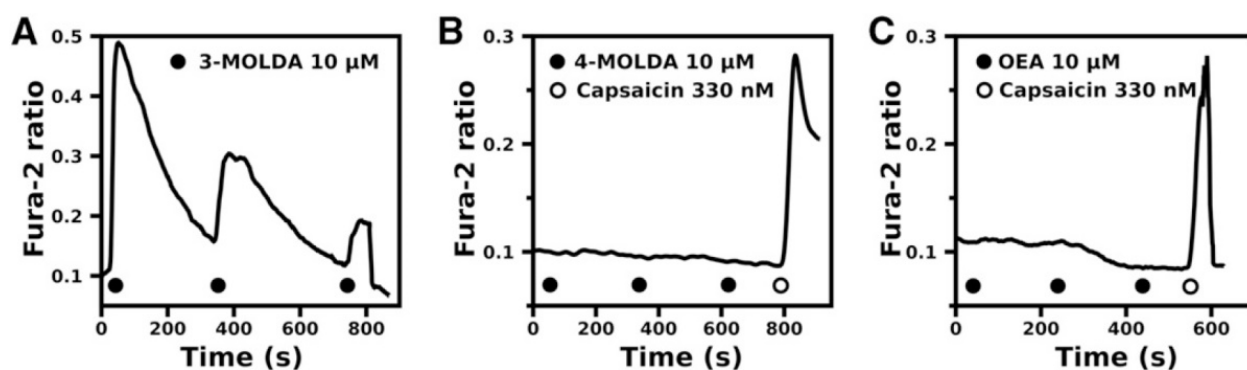
57. ábra. A 4-metil-*N*-oleoildopamin (4-MOLDA) és az *N*-oleoiletanolamid (OEA) gátló hatása a 100 nM kapszaicinnal kiváltott radioaktív $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvételre patkány TRPV1-gyel transzfektált HT5-1 sejtekben. Az adatok a 100 nM kapszaicinnal kiváltott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvétel százalékában kifejezett értékek átlag \pm SEM formában (n=4 mindkét szernél).

A zsírsavamidok hatása az intracelluláris Ca^{2+} -szintre HT5-1 sejt vonal sejtjeiben és tenyésztett patkány trigeminális neuronokban

Mind a kapszaicin (330 nM), mind az OLDA (3 μM) Ca^{2+} -tranzienseket váltott ki HT5-1 sejt vonal sejtjeiben és tenyésztett trigeminális neuronokban (**58. ábra**), amelyek amplitúdója ismételt adás esetén csökkent, jelezve a deszenzibilizációt (ez utóbbi a HT5-1 sejtek esetében kifejezettebb volt). Az OLDA által kiváltott válasz mindkét sejt típusban lassabb kinetikát mutatott. A 3-MOLDA 10 μM koncentrációban átmenetileg megnövelte az intracelluláris Ca^{2+} -szintet trigeminális neuronban, és ez a válasz ismételt adagolás során jelentős tachyphylaxiát mutatott (**59. ábra**). Ezzel szemben sem a 10 μM 4-MOLDA, sem a 10 μM OEA nem váltott ki Ca^{2+} -tranzienst a neuronokban. A később pozitív kontrollként adott 330 nM kapszaicin egyértelmű választ okozott, jelezve, hogy a neuronok expresszálják a TRPV1-receptort.



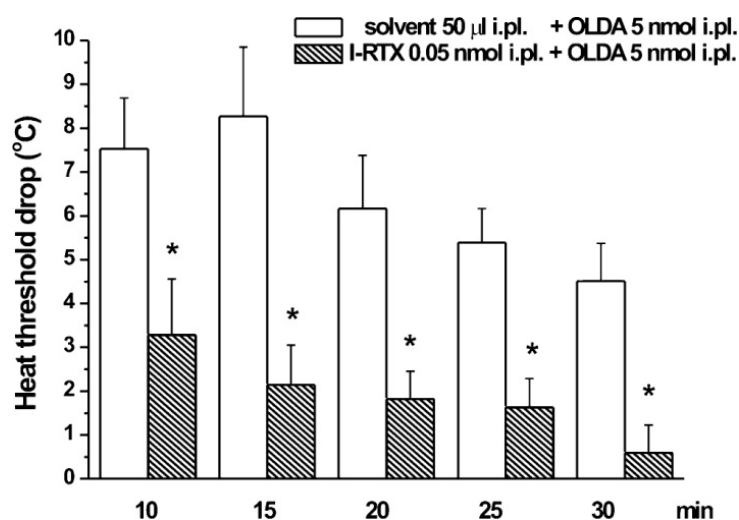
58. ábra. A kapszaicin és az *N*-oleoildopamin (OLDA) hatása az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációra patkány TRPV1-gyel transzfektált HT5-1 sejtekben (**felső panelek**) és tenyésztett trigeminális neuronokban (**alsó panelek**) fura-2 mikrofluorimetriával mérve. A kapszaicint és az OLDA-t 20 másodpercig alkalmaztuk. A regisztrátumok 5 HT5-1 és 2 trigeminális sejtben egyidejűleg történt mérés (340/380 nm fluoreszcenciaarány) átlagát mutatják.



59. ábra. A kapszaicin, 3-metil-*N*-oleoildopamin (3-MOLDA, **A panel**), 4-metil-*N*-oleoildopamin (4-MOLDA, **B panel**) és az *N*-oleoiletanolamid (OEA, **C panel**) hatása az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációra tenyésztett trigeminális neuronokban fura-2 mikrofluorimetriával mérve. A mutatott érték egy reprezentatív sejt felett mért 340/380 nm fluoreszcenciaarány mindhárom panel esetében. A sötét körök 3 egymás utáni, 10 s tartamú 3-MOLDA, 4-MOLDA, illetve OEA applikációt jelentenek. Az üres körök a pozitív kontrollként használt 10 másodperces kapszaicinexpozíciót jelentik.

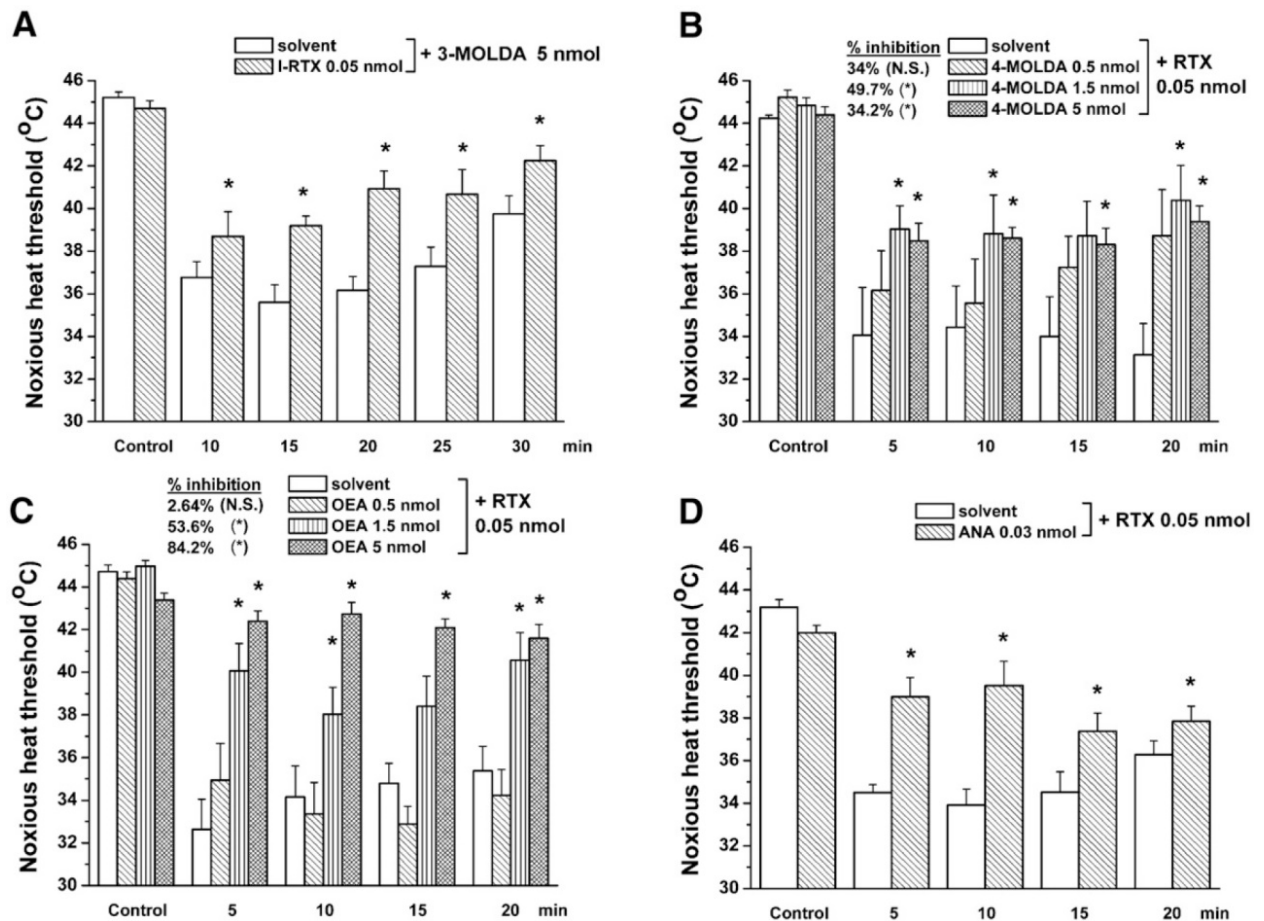
A zsírsavamidok hatása a nociceptív hőküszöbre patkányban

Az OLDA intraplantáris injekciója (5 nmól) nocifenzív reakciót (a láb emelése és nyalása) váltott ki patkányokban, amely 10 percen belül megszűnt. Ezt követően 6–9 °C-kal lecsökkent a nociceptív hőküszöb a 10–30 perces időintervallumban (**60. ábra**) úgy, hogy az a 60. percre visszatért a kontroll értékre. A szintén intraplantárisan adott TRPV1-antagonista I-RTX-szel (Wahl *et al.*, 2001; 4.3.3. pont) végzett előkezelés (0,05 nmól, 5 perc) minden mérési időpontban (a 10–30 perces intervallumban) szignifikánsan gátolta az OLDA hőküszöbcsökkentő hatását az I-RTX szolvenséhez viszonyítva (**60. ábra**), igazolva, hogy az OLDA hatásában a TRPV1-receptorok aktivációja szerepet játszik. Tekintettel arra, hogy az 5 nmol OLDA által kiváltott hőküszöbcsökkenés valamivel kisebb volt, mint a korábbi kísérletsorozatban (lásd 4.3.3. pont) vizsgált 0,05 nmól RTX-é, elmondható, hogy a hőküszöbcsökkentési paradigmában az OLDA kb. 100-szor kevésbé potens TRPV1-agonista, mint a referenciavegyület RTX.



60. ábra. Az intraplantárisan (i.pl.) adott *N*-oleoildopamin (OLDA) hatása a patkány hátsó lábán az emelkedő hőmérsékletű forró lappal mért nociceptív hőküszöbre a TRPV1-receptor-antagonista jódresiniferatoxinnal (I-RTX) vagy annak szolvensével történt 5 perces előkezelés után. Az adatok átlag±SEM (n=8). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket ($p < 0,05$, Student-féle kétmintás t-próba) jeleznek a szolvenshez képest.

A 3-MOLDA intraplantáris injekciója (5 nmól) szintén nocifenzív reakciót (a láb emelése és nyalása) váltott ki, amely 10 percen belül megszűnt. Ezt követően a vegyület hatására lecsökkent a nociceptív hőküszöb (**61. ábra, A panel**), legalább 30 percig. Ezt a küszöbcsökkenést a TRPV1-antagonista I-RTX-szel végzett 5 perces intraplantáris előkezelés minden mérési időpontban szignifikánsan gátolta, jelezve a TRPV1-receptor-agonizmus szerepét az 3-MOLDA hatásában. A 3-MOLDA közel 10 °C-os hőküszöbcsökkentő hatása összemérhető a 0,05 nmól RTX-ével (lásd 4.3. pont); ennek alapján a 3-MOLDA hatáserőssége 100-szor kisebbre tehető, mint az RTX-é.



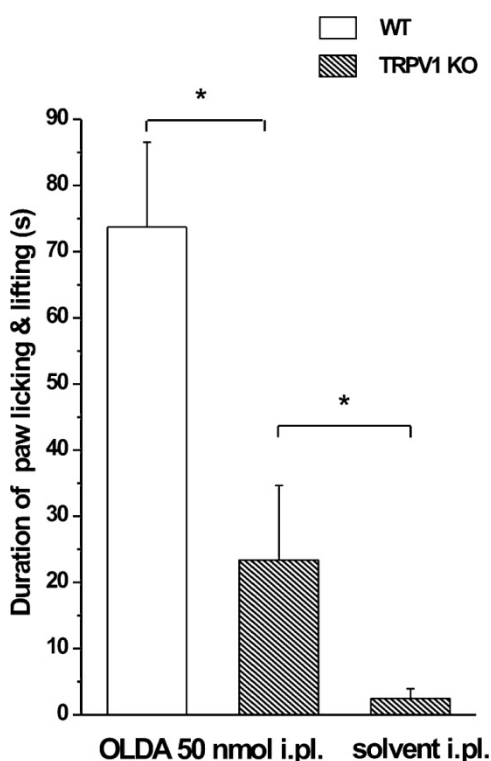
61. ábra. Az intraplantárisan adott szerek hatása a patkány hátsó lábán az emelkedő hőmérsékletű forró lappal mért nociceptív hőküszöbre. Az adatok átlag \pm SEM ($n=6-8$). A 3-metil-*N*-oleoildopamin (3-MOLDA, 5 nmól i.pl.) hatása a TRPV1-receptor-antagonista jóresiniferatoxinnal (I-RTX, 0.05 nmól i.pl.), illetve annak szolvansével történt 5 perces előkezelés után (**A panel**). A 4-metil-*N*-oleoildopamin (4-MOLDA, 0.5–5 nmól i.pl., **B panel**), *N*-oleoiletanolamid (OEA, 0.5–5 nmól i.pl., **C panel**) és az anandamid (ANA, 0.03 nmól i.pl., **D panel**) gátló hatása a TRPV1-receptor-agonista resiniferatoxinnal (RTX, 0.05 nmól i.pl.) kiváltott küszöbcsökkenésre. A B és C panelben a szolvans a közép dózis vehikulumát jelenti. A százalékos gátlást a 4.2. pontban említett képlettel számítottuk az 5., 10., 15. és 20. percben mért hőküszöbcsökkenések összegének átlaga alapján. A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket ($p<0.05$, Student-féle kétmintás *t*-próba) jeleznek a szolvanshoz képest egy adott időpontra, illetve a hőküszöbcsökkenések összegére vonatkozóan.

Sem a 4-MOLDA (5 nmól), sem az OEA (5 nmól) intraplantáris injekciója nem váltott ki nocifenzív reakciót vagy hőküszöbcsökkenést (adatokat nem mutatunk), jelezve, hogy e szerek nem rendelkeznek TRPV1-agonista hatással. Ugyanakkor a 4-MOLDA-val végzett intraplantáris előkezelés gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását (**61. ábra, B panel**). Érdekes módon a 4-MOLDA legmagasabb dózisa kisebb mértékű (34%-os) gátlást okozott, mint a közép dózis (50%); emiatt ID_{50} -érték meghatározására nem került sor. Az OEA-val történő lokális előkezelés szintén gátolta az RTX küszöbcsökkentő hatását (**61. ábra, C panel**); e szer gátló hatása dózisfüggő volt, 1,4 nmólos ID_{50} -értékkel.

Az arachidonil-etanolamid (anandamid) intraplantáris injekciója (0,03 nmól) nem váltott ki nocifenzív reakciót, és nem befolyásolta a nociceptív hőküszöböt a beadás után 30 percig vizsgálva (adatokat nem mutatunk). Ugyanakkor szintén gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását mind a négy mérési időpontban (**61. ábra, D panel**). Az anandamid gátló hatását a CB₁-receptor-antagonista SR141716A (0,18 nmól, i.pl.) együttes adása teljesen kivédte (adatokat nem mutatunk), igazolva a CB₁-receptorok kizárólagos közvetítő szerepét.

Az OLDA nocifenzív reakciót kiváltó hatása egérben

Az egér talpába adott OLDA (50 nmól) nocifenzív reakciót (a láb emelése és nyalása) váltott ki, amelynek az időtartama szignifikánsan kisebb volt a TRPV1-génhiányos egerekben, mint a vad típusúakban (**62. ábra**). Azonban az OLDA – szemben a szolvensével – a TRPV1 KO egerekben is okozott némi nocifenzív reakciót, jelezve, hogy pronociceptív hatásában a domináns TRPV1-mediálta komponens mellett TRPV1-független mechanizmus is szerepet játszik.



62. ábra. Az intraplantárisan (i.pl.) adott *N*-oleoildopaminnal (OLDA) kiváltott nocifenzív reakció (láb emelése és nyalása) időtartama vad típusú és TRPV1-génhiányos egerekben az injekció utáni 5 perc során. Az adatok átlag±SEM (n=6). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket ($p < 0,05$, Student-féle kétmintás t-próba) jeleznek.

5.3.3. Megbeszélés és fontosabb következtetések

1. / A vizsgált zsírsavamidok közül az OLDA és a 3-MOLDA TRPV1-receptor-agonista hatására találtunk bizonyítékot: mindkét ágens $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -akkumulációt váltott ki TRPV1-gyel transzfektált sejtekben, Ca^{2+} -tranzienseket indukált trigeminális szenzoros neuronokban, intraplantáris adás után nocifenzív reakciót és a nociceptív hőküszöb csökkenését (termális allodynia) okozta, ezáltal utánozta a TRPV1-agonista kapszaicin, illetve RTX hatásait. A hőküszöbcsökkentési paradigmában mindkét ágens hatása blokkolható volt TRPV1-antagonistával. Mindkét ágens mind az *in vitro*, mind az *in vivo* modellekben jóval kevésbé potens TRPV1-agonistának bizonyult, mint a kapszaicin vagy az RTX. Az OLDA algogén hatásában a TRPV1-től független – közelebbről nem definiált – hatáselem(ek) létezését is sikerült igazolni.

2./ A 4-MOLDA és az OEA viselkedése a különféle vizsgált modellekben TRPV1-antagonista hatásra utal: nem váltottak ki $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -akkumulációt a TRPV1-gyel transzfektált sejtekben, sem Ca^{2+} -tranzienseket a trigeminális szenzoros neuronokban, intraplantáris adás után nem okoztak sem nocifenzív reakciót, sem a nociceptív hőküszöb csökkenését. Ugyanakkor gátolták a kapszaicinnal kiváltott $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -akkumulációt a TRPV1-gyel transzfektált sejtekben, és mérsékeltek az RTX hőküszöbcsökkentő hatását. Az eredmények alapján nem állapítható meg egyértelműen a TRPV1-antagonizmus típusa; a két legvalószínűbb mechanizmus a TRPV1-receptor kompetitív antagonizmusa, illetve a TRPV1 ioncsatorna-részének a blokkolása. A 4-MOLDA nagyfokú szerkezeti hasonlósága a TRPV1-agonistának bizonyuló 3-MOLDA-hoz és OLDA-hoz a szer kompetitív antagonista jellegét valószínűsíti.

3./ A 4-MOLDA hatásának érdekessége, hogy a szerrel elérhető maximális gátlás az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenésre vonatkozóan csak 50% volt, és ezt a legnagyobb hatást a középű dózis hozta létre. Ennek elméletileg lehetséges magyarázata, hogy a szer magasabb dózisban olyan, a TRPV1-től független hatást vált ki, amely fokozza az RTX hőküszöbcsökkentő hatását, ezáltal limitálja a TRPV1-antagonizmus mértékét.

4./ Bár az OEA jelen kísérleteinkben egyértelműen TRPV1-antagonistának mutatkozott, az irodalmi adatok ellentmondásosak: az ecetsavval kiváltott „writhing” tesztben (egér) és a formalintesztben (egér, patkány) a szer antinociceptív hatású volt (Suardiaz *et al.*, 2007), de egér vagális szenzoros neuronjait izgatta és visceralis nocicepciót okozott a TRPV1 aktiválása révén (Wang *et al.*, 2005). Szintén egérben az OEA TRPV1-függő nocifenzív reakciót okozott (Lo

Verme *et al.*, 2006). Bár az említett diszkrepanciák eredhetnek a fajok és a szöveti lokalizációk különbözőségéből, az sem zárható ki, hogy az OEA alacsony intrinszik hatékonyságú parciális agonista a patkány és egér TRPV1-receptoron, hasonlóan a humán TRPV1-hez (Movahed *et al.*, 2005). Ezáltal az OEA kompetitíve gátolhatja a nagyobb intrinszik hatékonyságú agonisták (kapszaicin, RTX) hatását, de magas koncentrációban TRPV1-agonista hatásokat produkálhat. A jelen kísérleteinkben alkalmazott koncentrációk valószínűsíthetően ez utóbbihoz nem voltak elegendők (véltetően az alacsony receptorsűrűség miatt), de a kapszaicin és az RTX hatásának kompetitív gátlásához igen.

5./ Az anandamid az *in vivo* modellünkben nem váltott ki nocifenzív reakciót és hőküszöbcsökkenést, de gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását, és ezt CB₁-receptor-antagonistával teljes mértékben ki lehetett védeni. Mindez arra utal, hogy a szer kizárólag CB₁-receptor-agonistaként viselkedett. Ezt azért fontos hangsúlyozni, mert az anandamid képes aktiválni a TRPV1-receptort is, bár ehhez magasabb koncentrációk szükségesek, mint a CB₁-receptor-stimulációhoz (Zygmunt *et al.*, 1999; Smart *et al.*, 2000; Németh *et al.*, 2003b; Ahluwalia *et al.*, 2003). Pro és kontra diszkutált lehetőségként felmerült, hogy az anandamid lenne a TRPV1-receptor endogén liganduma (Szolcsányi, 2000; Di Marzo *et al.*, 2001). A jelen adatok még egy – az RTX-hatást kompetitíve gátolni képes – parciális TRPV1-agonizmust is kizárnak, mivel a CB₁-receptor-antagonista 100%-ban kivédte az anandamid antiallodyniás hatását.

A vizsgált zsírsavamidok tulajdonságait a **10. táblázat** összegzi.

10. táblázat. A vizsgált zsírsavamidok összehasonlítása.

	OLDA	3-MOLDA	4-MOLDA	OEA	AEA
⁴⁵ Ca ²⁺ -felvétel Hatáserősség a kapszaicin-hez képest (EC ₅₀ alapján)	igen <50	igen <500	nem	nem	-
Kapszaicin-indukálta ⁴⁵ Ca ²⁺ -felvétel gátlása	-	-	igen	igen	-
Ca ²⁺ -tranzien	igen	igen	nem	nem	-
Nocifenzív reakció	igen	igen	nem	nem	nem
Hőküszöbcsökkenés Hatáserősség az RTX-hez képest (ED ₅₀ alapján)	igen <100	igen <100	nem	nem	nem
RTX-okozta hőküszöb- csökkenés gátlása	-	-	igen	igen	igen

5.4. A protein-kináz A és a protein-kináz C szerepe a TRPV1-receptor érzékenységének meghatározásában *in vitro* és *in vivo*

5.4.1. Előzmények és célkitűzések

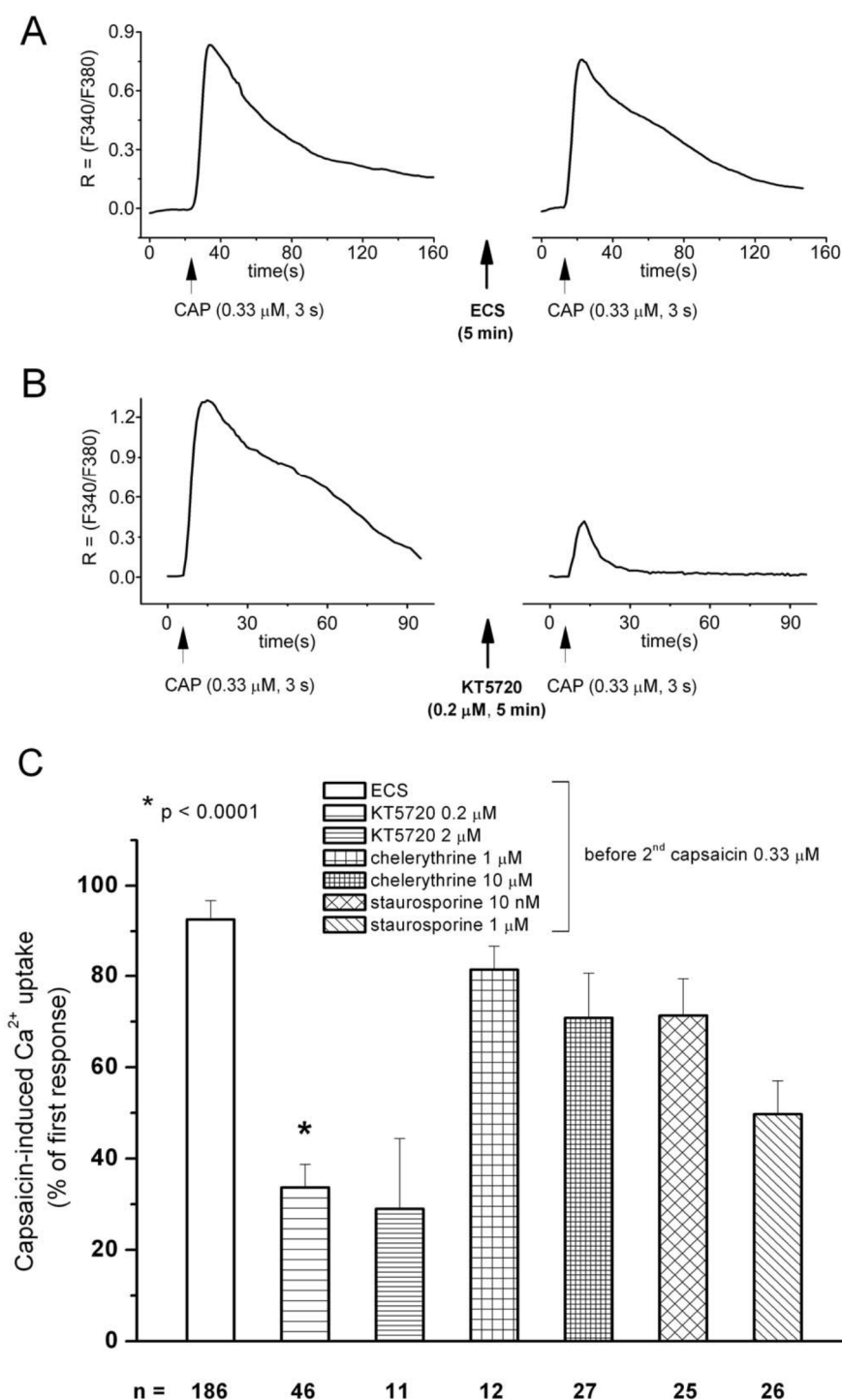
Ismert, hogy a TRPV1 foszforilációs státusza fontos szerepet játszik a receptor érzékenységének meghatározásában: a foszforiláció növeli, a defoszforiláció csökkenti a receptor válaszkészségét (a részleteket lásd a 1.4.1.2. pontban). Kísérleteink célja a PKA és PKC egymáshoz viszonyított szerepének összehasonlítása volt a TRPV1-receptor érzékenységének beállításában egyrészt alaphelyzetben, másrészt az említett enzimek farmakológiai stimulálása mellett. Tekintettel arra, hogy egy *in vitro* módszerrel a trigeminális nociceptorok sejttestének aktivációját vizsgáltuk, egy másik *in vivo* modellben pedig a patkánytalp nociceptív idegvégződéseinek hőstimulációjával kiváltott nocifenzív reakciót, lehetőség nyílt a PKA és PKC szerepének összehasonlítására sejttest *versus* perifériás terminális vonatkozásban is.

5.4.2. Eredmények

Patkány trigeminális neuronok kapszaicinnal kiváltott Ca^{2+} -szignáljának jellegzetességei és proteinkináz-gátlók általi modulációja

Kapszaicin (0,33 μ M, 3 s kontaktusidő) hatására átmenetileg – 20 s-tól 3 percreg terjedő intervallumban – megemelkedett az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció (**63. ábra, A és B panel**). A tesztelt kis méretű neuronok (n=392) 77,5%-a bizonyult kapszaicinérzékenynek azon kritérium alapján, hogy a ratiometrikus fluoreszcenciaválasz (F340/F380) maximuma meghaladta a 0,1-es értéket. Az 5 perccel később ismételt alkalmazott kapszaicin hatására kialakuló válasz maximumát elosztva az első expozíció hatására kialakuló maximummal szignifikánsan kisebb, $92,6 \pm 4,1\%$ -os értéket kaptunk (n=186, $p < 0,001$, Student-féle egymintás t-próba, **63. ábra, A és C panel**), jelezve a tachyphylaxia kialakulását. A TRPV1–6-receptorokat blokkoló ruténiumvörössel (0,2 μ M) végzett 5 perces előkezelés hatására a második kapszaicinválasz maximuma $4,5 \pm 0,8\%$ -ra csökkent, igazolva a TRPV1-receptor közvetítő szerepét (n=14, $p < 0,001$, ANOVA utáni Tukey-teszt). EGTA-val kalciummentessé tett szuperfúziós médiumban az 1 μ M kapszaicin semmiféle Ca^{2+} -választ nem váltott ki, jelezve az extracelluláris Ca^{2+} -ionok beáramlásának kizárólagos szerepét (adatot nem mutatunk). A PKA-t szelektíven gátló KT5720 (0,2 μ M) 5 perces előkezelés után $33,7 \pm 5,0\%$ -ra csökkentette a második kapszaicinexpozícióval kiváltott Ca^{2+} -tranziens maximumát. Ez a gátlás szignifikánsan nagyobb volt, mint az ismételt kapszaicinadás okozta tachyphylaxia (n=46, $p < 0,001$, ANOVA utáni Tukey-teszt, **63. ábra, B és C panel**). Meglepő módon a 10-szer magasabb

koncentrációban adott KT5720 gátló hatása numerikusan nagyobb volt ($29 \pm 15,4\%$ -ra való csökkenés), de statisztikailag nem szignifikáns (**63. ábra, C panel**).



63. ábra. Ismételt kapszaicinadás hatása az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációra patkány tenyésztett trigeminális neuronokban a racimétrikus (F_{340}/F_{380}) válasz alapján extracelluláris oldattal (ECS, **A panel**) vagy KT5720-szal (**B panel**) történő szuperfúzió után (reprezentatív regisztrátum). **C panel:** ECS, illetve proteinkináz-gátló ágensek hatása a kapszaicinnal kiváltott Ca^{2+} -tranzienstre 5 perces szuperfúziót követően ismételt kapszaicinadás mellett. Az ábra a második kapszaicinadással nyert racimétrikus válasz (F_{340}/F_{380}) maximumát mutatja az első százalékában. Az oszlopok átlag \pm SEM értékek. A csillag statisztikailag szignifikánsan eltérő értéket jelöl az ECS-előkezeléshez viszonyítva (egyszempontos ANOVA utáni Tukey-teszt).

Ennek a kisebb esetszám miatti nagyobb variabilitás állhat a hátterében. A két KT570-koncentráció hatásának hasonló mértéke azt sugallja, hogy már a kisebb koncentrációval elértük a lehetséges maximális PKA-gátlást. A szelektív PKC-gátló chelerythrin-kloriddal (1 és 10 μM) végzett előkezelés hasonló mértékben gátolta a második kapszaicinválaszt, mint az ismételt adás miatti tachyphylaxia (**63. ábra, C panel**). Ugyanakkor a 10 μM chelerythrin-klorid jelentősen csökkentette a PKC-aktiváló PMA-val (1 μM , 10 s) kiváltott Ca^{2+} -tranzienst (csökkenés $9,4 \pm 5,9\%$ -ra, $n=23$, $p<0,01$, egyszempontos ANOVA utáni Tukey-teszt), igazolva a szer PKC-gátló képességét. A nem-szelektív, PKC-t és PKA-t egyaránt gátló staurosporin – a chelerythrin-kloridhoz hasonlóan – mindkét alkalmazott koncentrációban (10 nM és 1 μM) csak annyira csökkentette a második kapszaicinválaszt, mint az ismételt kapszaicinadás (**63. ábra, C panel**).

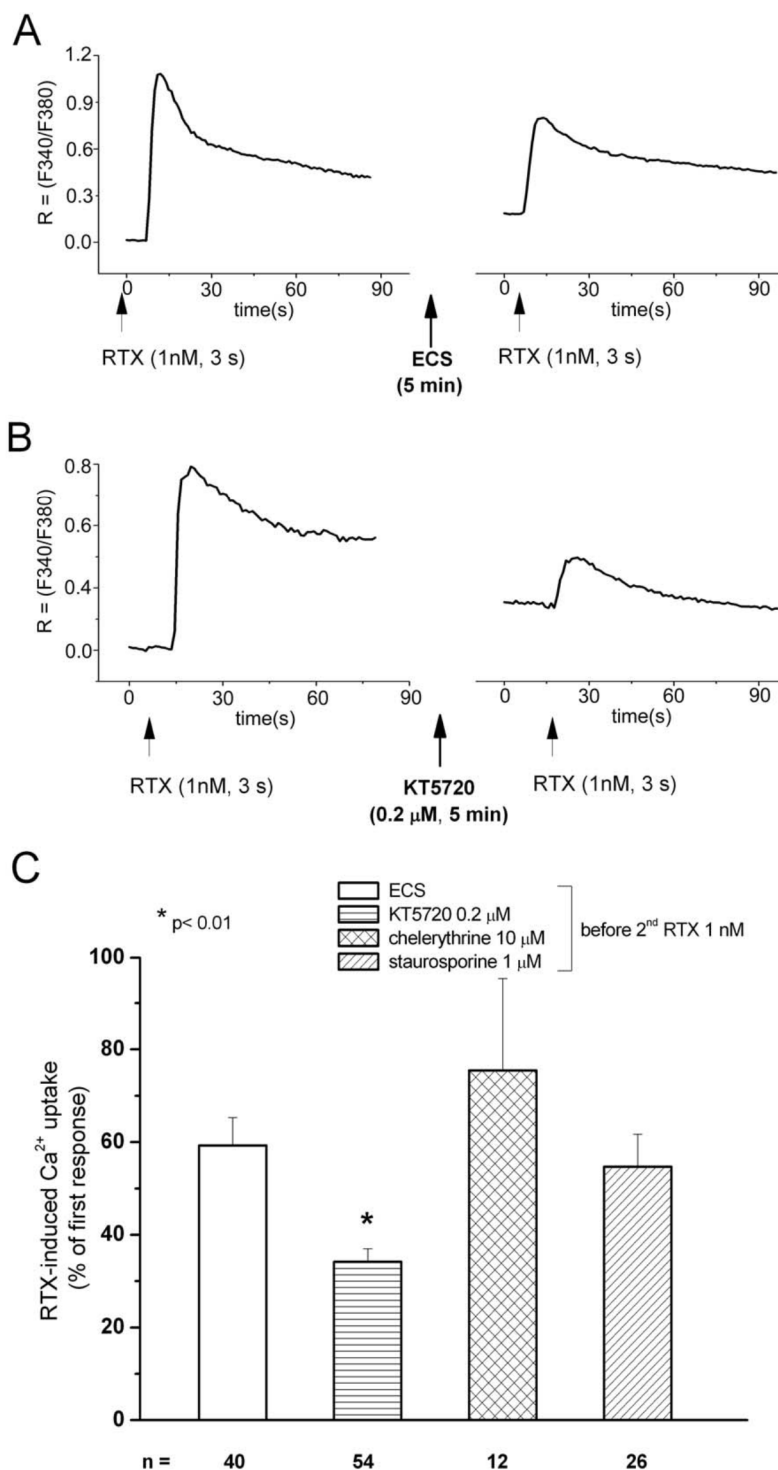
Patkány trigeminális neuronok RTX-szel kiváltott Ca^{2+} -szignáljának jellegzetességei és proteinkináz-gátlók általi modulációja

A potens TRPV1-agonista RTX alkalmazása (1 nM, 3 s) is megemelte az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt (**64. ábra, A és B panel**). A neuronok 55%-a reagált a szerre, és a kapszaicin hatásától eltérően az RTX adása után 5 percen belül nem tért vissza a Ca^{2+} -szint a kiindulási értékre, hanem egy platót mutatott. Emiatt az 5 perccel később megismételt RTX-adás után kialakuló második válasz maximális amplitúdójából kivontuk a megemelt alapszint értékét, és ezt a különbséget osztottuk el az első válasz maximális amplitúdójával a normalizálás során. A második válasz az elsőnek az $59,3 \pm 6,0\%$ -a volt, jelezve a jelentős tachyphylaxiát ($n=40$, $p<0,001$, Student-féle egymintás t-próba, **64. ábra, A és C panel**). KT5720 (0,2 μM) előkezelést követően a második RTX-válasz ($34,2 \pm 2,8\%$) szignifikánsan kisebb volt, mint önmagában a tachyphylaxia mértéke ($n=54$, $p<0,01$, egyszempontos ANOVA utáni Tukey-teszt, **64. ábra, B és C panel**). Ezzel szemben sem a chelerythrin-klorid, sem a staurosporin magasabb koncentrációjának adása nem okozott szignifikánsan nagyobb csökkenést a második RTX-válaszban, mint a tachyphylaxia (**64. ábra, C panel**).

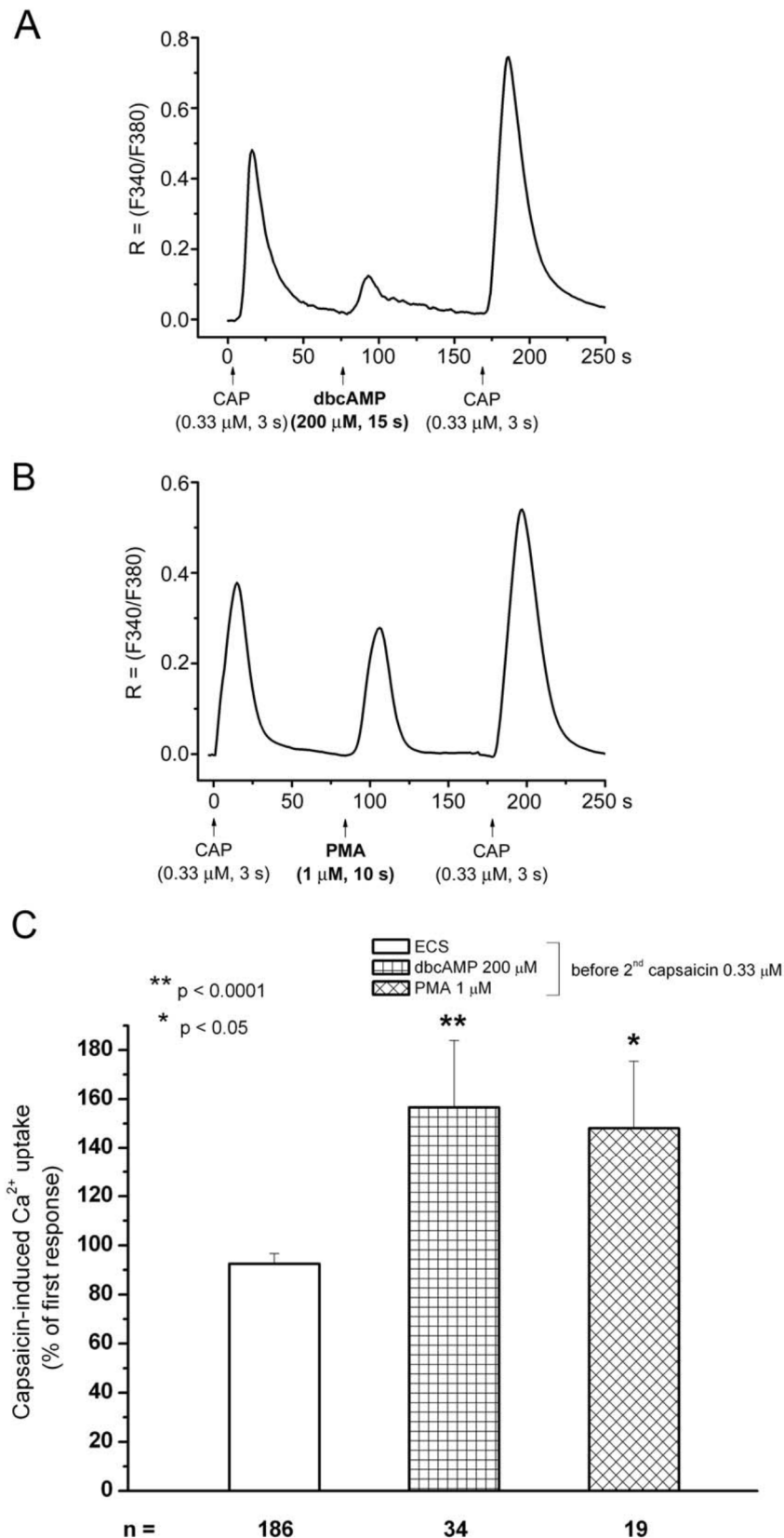
A proteinkináz-aktivátorok hatása a trigeminális neuronok kapszaicinnal kiváltott Ca^{2+} -akkumulációjára

A sejtmembránon áthatolni képes és a PKA-t aktiváló cAMP-analóg dibutiril-cAMP (dbcAMP, 200 μM , 15 s) $56,7 \pm 27,2\%$ -kal fokozta a kapszaicinnal kiváltott Ca^{2+} -tranzienst, ami szignifikánsan eltér az ismételt kapszaicinadáshoz képest ($n=34$, $p<0,0001$, egyszempontos ANOVA utáni Tukey-teszt, **65. ábra, A és C panel**). A szelektív PKC-aktivátor forbolészter PMA (1 μM , 10 s) hasonlóképpen szignifikánsan, $48,1 \pm 27,4\%$ -kal megnövelte a kapszaicinnal

kiváltott Ca^{2+} -akkumulációt ($n=19$, $p<0,05$, egyszempontos ANOVA utáni Tukey-teszt, **65. ábra, B és C panel**). Mind a dbcAMP, mind a PMA önmagában átmeneti Ca^{2+} -szignált váltott ki, amely lecsengett a második kapszaicinadásig (**65. ábra, A és B panel**).



64. ábra. Ismételt RTX-adás hatása az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációra tenyésztett trigeminális neuronban a racimetrikus (F_{340}/F_{380}) válasz alapján extracelluláris oldattal (ECS, **A panel**) vagy KT5720-szal (**B panel**) történő szuperfúzió után (reprezentatív regisztrátum). **C panel:** ECS, illetve proteinkináz-gátló ágensek hatása az RTX-szel kiváltott Ca^{2+} -transziensre 5 perces szuperfúziót követően ismételt RTX-adás mellett. Az ábra a második RTX-adással nyert racimetrikus válasz maximumát mutatja az első százalékában. Az oszlopok átlag \pm SEM értékek. A csillag statisztikailag szignifikánsan eltérő értéket jelöl a ECS-előkezeléshez viszonyítva (egyszempontos ANOVA utáni Tukey-teszt).



65. ábra. Ismételt kapszaicin (CAP) applikáció hatása az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációra tenyésztett trigeminális neuronban a racimétrikus (F_{340}/F_{380}) válasz alapján dbcAMP-vel (**A panel**) vagy PMA-val (**B panel**) történő szuperfúzió után (reprezentatív regisztrátum). **C panel:** extracelluláris oldat (ECS), illetve proteinkináz-serkentő ágensek hatása a kapszaicinnal kiváltott Ca^{2+} -tranzienstre 5 perces szuperfúziót követően ismételt kapszaicinadás mellett. Az ábra a racimétrikus válasz maximumát mutatja oly módon normalizált formában, hogy a második adásnál mért értéket az első százalékában fejeztük ki. Az oszlopok átlag \pm SEM értékek. A csillagok statisztikailag szignifikánsan eltérő értéket jelölnek a ECS-előkezeléshez viszonyítva (egyszempontos ANOVA utáni Tukey-teszt).

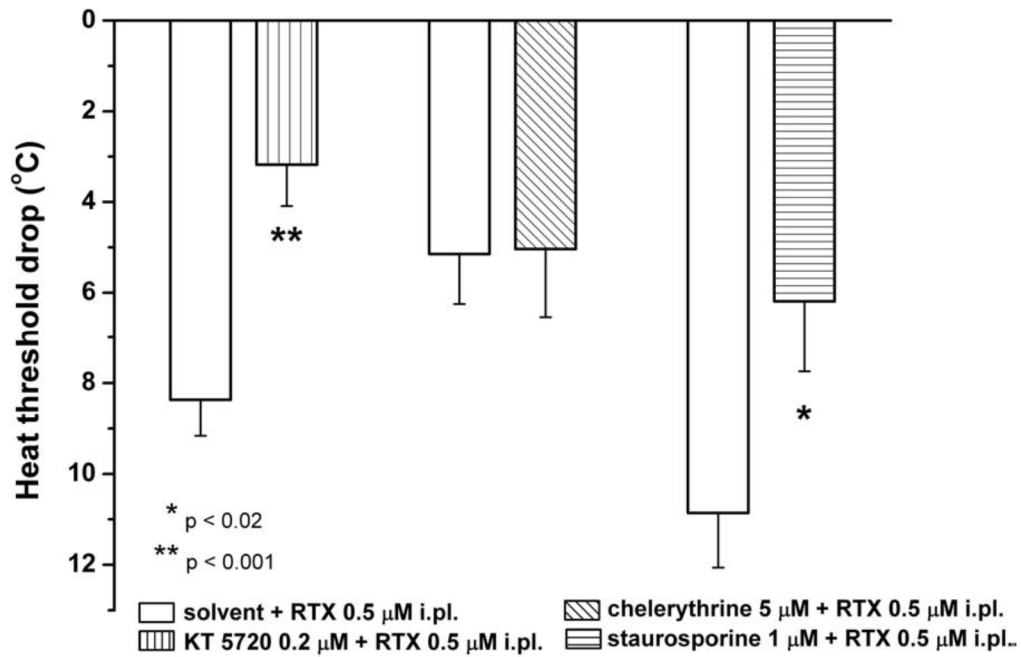
A proteinkináz-gátlók és -aktivátorok hatása a trigeminális neuronok magas koncentrációjú K^+ -ionnal kiváltott Ca^{2+} -akkumulációjára

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a proteinkinázok gátlásának, illetve stimulációjának esetleges nem-specifikus, a TRPV1-től független hatásait az intraneuronális Ca^{2+} -szintre, a magas koncentrációjú K^+ -ionnal kiváltott membrádepolarizáció modelljét alkalmaztuk. Mint ismeretes, a magas extracelluláris K^+ -koncentráció gátolja a kifelé irányuló, „szivárgó” K^+ -áramot, ezáltal depolarizálja a sejtmembránt. A depolarizáció aktiválja a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákat, intracelluláris Ca^{2+} -akkumulációt eredményezve. 50 mM káliumklorid hatására Ca^{2+} -tranzienst jött létre, amely 1 percen belül megszűnt. A KCl-expozíciót 5 perccel később megismételve szignifikánsan kisebb, $93,8 \pm 2,9\%$ -os Ca^{2+} -akkumulációt mértünk ($n=52$, $p<0,01$, Student-féle egymintás t-próba), jelezve a tachyphylaxia kialakulását. Sem a KT5720 (0,2 μ M), sem a chelerythrin-klorid (1 μ M), sem a staurosporin (1 μ M), sem pedig a dbcAMP (200 μ M), illetve a PMA (1 μ M) nem okozott szignifikáns változást a második K^+ -expozícióval kiváltott Ca^{2+} -akkumuláció mértékében a tachyphylaxiához viszonyítva (egyszempontos ANOVA utáni Tukey-tesztel vizsgálva).

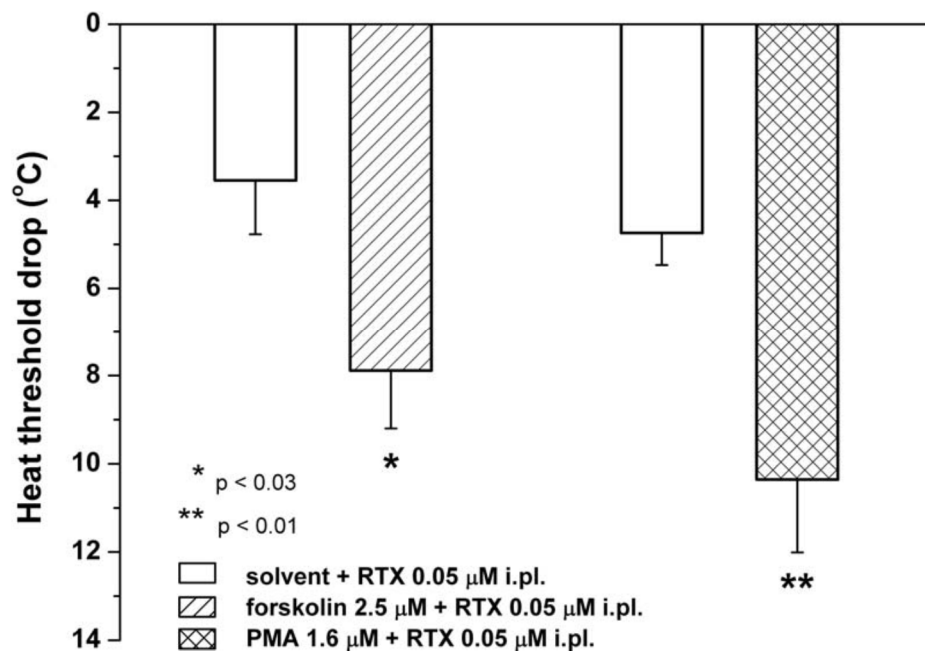
A proteinkináz-gátlók és -aktivátorok hatása az RTX-szel kiváltott hőküszöbcsökkenésre

Korábbi adatainknak megfelelően az RTX intraplantáris injekciója (0,5 μ M, 100 μ l) lecsökkentette az emelkedő hőmérsékletű forró lappal mért nociceptív hőküszöböt, azaz termális allodyníát váltott ki, amely maximumát az 5. percben érte el ($> 8^\circ\text{C}$), és 20 perc alatt lecsengett. Az RTX előtt 5 perccel szintén intraplantárisan adott KT5720 (0,2 μ M, 50 μ l) szignifikánsan (62%-kal) gátolta az RTX 5. percben mért hőküszöbcsökkentő hatását ($p<0,001$, Student-féle kétmintás t-próba, **66. ábra**). Hasonló eredményt kaptunk a staurosporinnal (1 μ M, 50 μ l), amelynek gátló hatása 43% volt ($p<0,02$, Student-féle kétmintás t-próba) míg a chelerythrin-kloriddal (5 μ M, 50 μ l) végzett előkezelés nem befolyásolta szignifikánsan az RTX hatását (**66. ábra**).

A protein-kinázok aktivátorainak vizsgálatokor 10-szer kisebb koncentrációban (0,05 μ M, 100 μ l) adtuk az RTX-et intraplantárisan az esetleges „ceiling” effektus elkerülése céljából. A PKA-t aktiváló forskolin (2,5 μ M, 50 μ l) szintén 5 perces előkezelést követően 121,9%-kal fokozta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását az 5 perces mérés alapján ($p<0,03$, Student-féle kétmintás t-próba, **67. ábra**). A PMA (1,6 μ M, 50 μ l) hasonló hatás váltott ki (118,7%, $p<0,01$, Student-féle kétmintás t-próba). Önmagában (RTX nélkül) adva egyik proteinkináz-gátló vagy –aktiváló ágens sem befolyásolta a nociceptív hőküszöböt az intraplantáris injekció utáni 5–20. percben vizsgálva (adatokat nem mutatunk).



66. ábra. Intraplantárisan adott proteinkináz-gátlók (50 μ l-ben adva) hatása az 5 perccel később szintén a talpba adott RTX-szel (100 μ l-ben) kiváltott, az 5. percben mért nociceptív hőküszöbcsökkenésre. Az oszlopok átlag \pm SEM értékek (n=8–10). A csillagok statisztikailag szignifikánsan eltérő értéket jelölnek az adott szer szolvenségéhez viszonyítva (Student-féle kétmintás t-próba).



67. ábra. Intraplantárisan adott proteinkináz-serkentők (50 μ l-ben adva) hatása az 5 perccel később szintén a talpba adott RTX-szel (100 μ l-ben) kiváltott, az 5. percben mért nociceptív hőküszöbcsökkenésre. Az oszlopok átlag \pm SEM értékek (n=8–10). A csillagok statisztikailag szignifikánsan eltérő értéket jelölnek az adott szer szolvenségéhez viszonyítva (Student-féle kétmintás t-próba).

5.4.3. Megbeszélés

Vizsgálataink során először hasonlítottuk össze a PKA és PKC egymáshoz viszonyított szerepét a TRPV1-receptor válaszkészségének kialakításában mind alaphelyzetben, mind az említett proteinkináz-enzimek stimulációjakor. *In vitro* kísérleteinkben a TRPV1 két standard agonistájával, a kapszaicinnal és az RTX-szel kiváltott neuronális Ca^{2+} -akkumulációt analizáltuk. A kapszaicinnal kiváltott Ca^{2+} -tranziens a TRPV1 aktivációjának eredményeként alakult ki, mivel a választ a funkcionális TRPV1-receptor-antagonista ruténiumvörös jelentősen gátolta. A hatás az extracelluláris térből a neuronba történő Ca^{2+} -beáramlás eredményeképp jött létre, mivel Ca^{2+} -mentes közegben nem volt kiváltható, megerősítve korábbi ilyen irányú adatot (Jerman *et al.*, 2000). Bár a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák minden bizonnyal aktiválódnak a TRPV1-en keresztüli befelé irányuló Na^+ -áram okozta membrándepolarizáció révén, a vizsgált Ca^{2+} -tranziens valószínűleg független e csatornáktól, mivel a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák blokkolói nem gátolták a kapszaicin hatását TRPV1-gyel transzfektált sejtekben, illetve nem csökkentették a kapszaicinnal kiváltott neuropeptid-felszabadulást izolált tracheából (Jerman *et al.*, 2000; Németh *et al.*, 2003a). Az RTX 33-szor alacsonyabb koncentrációban váltott ki Ca^{2+} -akkumulációt, mint a kapszaicin, igazolva nagy hatáserősségét. Mind a kapszaicin, mind az RTX ismételt adásakor tachyphylaxia volt tapasztalható; az RTX-nél nagyobb mértékben, összhangban korábbi irodalmi adatokkal (Szolcsányi *et al.*, 1990; Szállási és Blumberg, 1999; Szolcsányi, 2002).

A szelektív PKA gátló KT5720 gátolta mind a kapszaicinnal, mind az RTX-szel kiváltott Ca^{2+} -akkumulációt a trigeminális neuronokban, ugyanakkor nem befolyásolta a magas koncentrációjú K^+ -ionnal – mint kontrollstimulussal – kiváltott Ca^{2+} -tranzienst, amely a depolarizációval megnyitott feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák révén jött létre. Ez utóbbi eredmény azt jelenti, hogy a PKA-gátló valószínűsíthetően a TRPV1-receptor válaszkészségének befolyásolása révén hatott, nem pedig valamilyen nem-specifikus módon a celluláris Ca^{2+} -homeosztázis módosításával (pl. a Ca^{2+} -kipumpálás serkentésével). A PKC szelektív gátlása nem befolyásolta a kapszaicinnal vagy RTX-szel kiváltott Ca^{2+} -akkumulációt, ugyanakkor csökkentette a PKC-t aktiváló PMA hatását, jelezve, hogy a chelerythrin-klorid az alkalmazott koncentrációban képes volt a PKC gátlására a trigeminális neuronokban. Korábbi vizsgálatainkban igazoltuk, hogy az RTX hőküszöbcsökkentő hatása a TRPV1-receptor aktiválása révén alakul ki (4.3.3. pont), emiatt az RTX-allodynia mérése alkalmas a TRPV1 funkciójának analízisére. Az *in vitro* nyert adatokkal egybevágó eredményeket szolgáltatottak az *in vivo* kísérletek: az intraplantárisan adott szelektív PKA-gátló gátolta a szintén helyileg adott RTX hőküszöbcsökkentő hatását, ugyanakkor a lokális PKC-gátlás nem befolyásolta az RTX-

okozta termális allodyniát. Valószínűsíthető, hogy az enzimgátlók és az RTX interakciója helyileg, a perifériás nociceptorokban jött létre. Mindez arra utal, hogy alaphelyzetben a PKA révén végbemenő foszforiláció lényeges szerepet játszik a TRPV1-receptor agonisták iránti válaszkészségének fenntartásában mind a trigeminális nociceptorok sejttestében, mind a talp nociceptorainak perifériás terminálisaiban, ellenben a PKC ilyen irányú szerepe nem mutatható ki. Említésre érdemes, hogy más kísérletes paradigmákban a PKA szerepét a TRPV1 alapérzékenységének beállításában nem tudták kimutatni sem TRPV1-gyel transzfektált sejtekben, sem egér vagy patkány DRG neuronjaiban, sőt, inkább a PKC ilyen irányú szerepére vonatkozóan találtak bizonyítékot (Jerman *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Shu és Mendell, 2001; Hu *et al.*, 2002; Bonnington és McNaughton, 2003; Amadesi *et al.*, 2004). Mindez a trigeminális és a DRG neuronok közötti különbségre utal. A nem-szelektív (PKA-t és PKC-t egyaránt gátolni képes) staurosporin nem hatott a kapszaicinnal vagy RTX-szel kiváltott Ca^{2+} -akkumulációra a trigeminális neuronokban, de gátolta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását. Ennek magyarázata az eltérő szöveti környezet lehet a két modellben: a szer valószínűleg jelentősen gátolta a PKA-t a bőr nociceptoraiban, de valami oknál fogva csak kevésbé a trigeminális neuronokban. A PKA szerepe a TRPV1 alapérzékenységének beállításában két, egymást nem kizáró mechanizmussal valósulhat meg. Egyik lehetőség a TRPV1 farmakológiai érzékenységének fokozódása a receptor PKA-közvetítette foszforilációja révén. Ez a mechanizmus mind az *in vitro*, mind az *in vivo* modellünkben szerepet játszhatott. Az *in vitro* rendszerben – ahol a kapszaicin, illetve az RTX ismételt adására került sor és hatásuk tachyphylaxiát mutatott – egy másik lehetőség a TRPV1 deszenzibilizációjának a csökkentése. Ismert, hogy a cAMP–PKA tengely aktiválódása képes csökkenteni a TRPV1 deszenzibilizációját a receptor foszforilációja révén (Bhave *et al.*, 2002; Mohapatra és Nau, 2003; 2005).

Mind a PKA-aktiváló dbcAMP, mind a PKC-stimuláló PMA növelte a kapszaicinnal kiváltott Ca^{2+} -akkumulációt a trigeminális neuronokban, anélkül, hogy befolyásolta volna a K^{+} -ionnal kiváltott választ, jelezve, hogy mindkét protein-kináz serkentése képes fokozni a TRPV1-receptor agonista iránti érzékenységet *in vitro*. Az RTX-allodynia vizsgálata során nyert eredmények kompatibilisek ezzel a nézettel, hiszen mind az adenilil-cikláz-aktivátor forskolin, mind a PMA fokozta az RTX hőküszöbcsökkentő hatását, anélkül, hogy befolyásolta volna a bazális hőküszöböt. A PKA (Hingtgen *et al.*, 1995; Lopshire and Nicol, 1998; De Petrocellis *et al.*, 2001; Rathee *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2003; Sugiura *et al.*, 2004) és a PKC (Cesare *et al.*, 1999; Cesare és McNaughton, 1996; Premkumar és Ahern, 2000; Jerman *et al.*, 2000; Vellani *et al.*, 2001; Tominaga *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Sugiura *et al.*, 2002, 2004; Crandall *et al.*, 2002; Numazaki *et al.*, 2002; Obreja *et al.*, 2002; Bhave *et al.*, 2003; Premkumar

et al., 2004; Amadesi *et al.*, 2004; Mandadi *et al.*, 2004) TRPV1-érzékenyítő szerepére bőséges irodalmi adat áll rendelkezésre, elsősorban TRPV1-gyel transzfektált sejtek és tenyésztett DRG neuronok vizsgálata alapján.

Mind a dbcAMP, mind a PMA önmagában (a második kapszaicinexpozíciót megelőzően) átmenetileg megnövelte az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációt. Ez arra utal, hogy a PKA és a PKC serkentése oly mértékben facilitáló hatású a Ca^{2+} -permeabilis ioncsatornákra, kézenfekvően a TRPV1-re és/vagy feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornákra, hogy azok aktiváló stimulus (agonista, illetve depolarizáció) hiányában is megnyílnak. Ezzel összhangban a PKC stimulációja TRPV1-közvetítette Ca^{2+} -akkumulációt okozott szenzoros neuronokban (Premkumar és Ahern, 2000), illetve a bradikinin a PKC-n keresztül lecsökkentette a TRPV1 hőküszöbét az aktuális hőmérséklet alá (Sugiura *et al.*, 2002).

Az az eredményünk, hogy a PKA és PKC serkentése, illetve gátlása nem befolyásolta a kiindulási, az RTX adása előtt mért bazális nociceptív hőküszöböt, két szempontból igényel kommentárt. Egyrészt valószínűsíti, hogy a szerek a TRPV1 válaszkészségének módosítása révén fejtették ki hatásaikat az RTX-indukálta hőküszöbcsökkenésre. Másfelől, hangsúlyozandó, hogy a TRPV1 nem játszik szerepet a bazális nociceptív hőküszöb meghatározásában patkány vagy egér talpán (lásd 4.3., 4.6. és 5.6. pont), ezt a funkciót valószínűleg más hőérzékeny csatornák közvetítik. Ugyanakkor a TRPV1 RTX általi aktivációja a nociceptív hőküszöb csökkenéséhez, azaz termális allodynia kialakulásához vezet.

5.4.4. Fontosabb következtetések

1./ Elsőként hasonlítottuk össze a PKA és PKC szerepét a TRPV1-receptor válaszkészségének meghatározásában ugyanabban az *in vitro* (patkány trigeminális neuronok kapszaicinnel, illetve RTX-szel kiváltott Ca^{2+} -akkumulációja) és *in vivo* (RTX-okozta hőküszöbcsökkenés patkányban) modellben.

2./ Az *in vitro* és az *in vivo* modellben nyert konkordáns adatok alapján alaphelyzetben a TRPV1-receptor agonisták irányi érzékenységeinek beállításában a PKA jelentős szereppel bír, a PKC viszont nem.

3./ Mind a PKA, mind a PKC stimulációja képes fokozni a TRPV1 válaszkészségét mind a trigeminális érző neuronok sejtestében, mind a talpbőr perifériás nociceptoraiban.

5.5. A decentralizált nociceptorok kémiai stimulációjával kiváltott távoli antiallodyniás hatás vizsgálata

5.5.1. Előzmények és célkitűzés

Amint arról az 1.5. pontban említés történt, Pintér és Szolcsányi különféle kísérleti elrendezésekben kimutatta, hogy a kapszaicinérzékeny primer afferens neuronok perifériás végződéséből elektromos vagy kémiai ingerlés hatására felszabaduló szomatosztatin bekerül a szisztémás keringésbe, és hormonként hatva a test távoli részeire eljutva gyulladásgátló hatásokat fejt ki, ami ezen idegvégződések „szenzokrin” funkcióját jelenti (Szolcsányi *et al.*, 1998a, 1998b). Például altatott patkány egyik hátsó lábának nociceptorait ingerelték antidrómos elektromos izgatással vagy kémiaileg (kapszaicinnel vagy mustárolajjal), és ennek kapcsán az ellenoldali lábon mustárolajjal vagy dextránnal kiváltott gyulladásos reakciót gyengülését tapasztalták (Szolcsányi *et al.*, 1998a; 1998b). Ez a hatás gátolható/kivédhető volt szomatosztatin-antiszérummal, a szomatosztatint depletáló cysteaminnal és a stimulált végtag krónikus denervációjával (ez utóbbi a szomatosztatin plazmaszintjének emelkedését is kivédte).

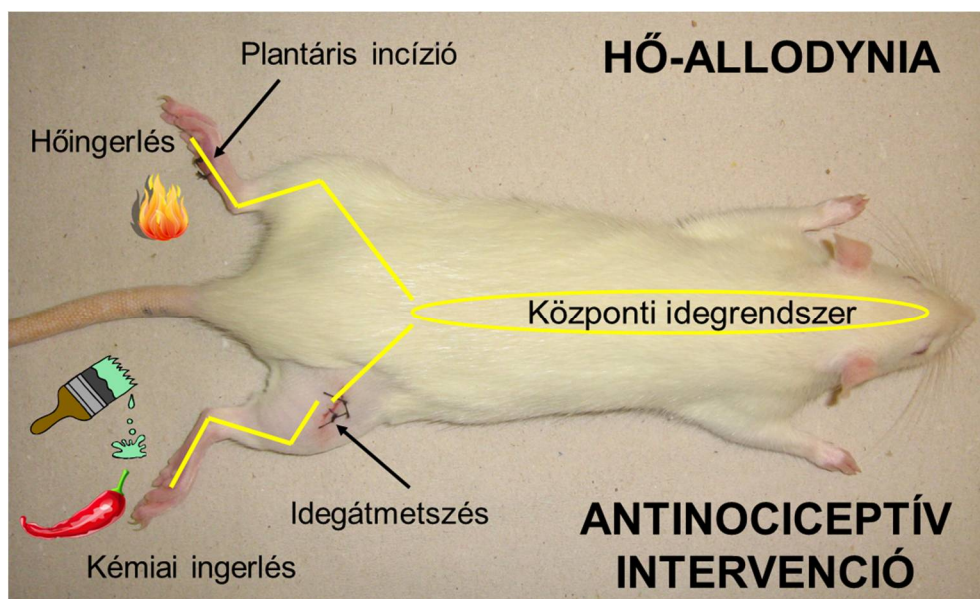
A szomatosztatin képes perifériás támadásponttal antinociceptív/analgetikus hatás kifejtésére (Silveri *et al.*, 1994; Heppelmann és Pavlak, 1997; Matucci-Cerinic és Marabini, 1998; Carlton *et al.*, 2001a; 2001b; 2003; Ji *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2014). Ezek alapján feltételezhető volt, hogy a szenzokrin hatás részeként a kapszaicinérzékeny nociceptorok izgatásakor távoli antinociceptív hatás is fellép. Erre vonatkozóan indirekt bizonyítékot szolgáltatott intézetünkben történt vizsgálatok, amelyekben krónikus gyulladásmodellekben azt tapasztalták, hogy a szomatosztatin hatásának genetikai vagy farmakológiai blokkolása mind a gyulladásos reakció, mind az azt kísérő mechanikai allodynia súlyosbodásához vezetett (Helyes *et al.*, 2004; 2009). Ezen túlmenően a Freund-adjuvánssal kiváltott ízületi gyulladás esetén a 10. naptól a plazma szomatosztatinszintjének emelkedését is sikerült kimutatni (Helyes *et al.*, 2004). Mindezek arra utalnak, hogy a nociceptorok szenzokrin funkciója nemcsak exogén – elektromos vagy kémiai – izgatás hatására, hanem patológiai folyamatok részeként is aktiválódhat, és ez mind gyulladásgátló, mind antiallodyniás hatáshoz vezet. Ugyanakkor az említett modellek krónikus jellege miatt nem volt eldönthető, hogy a megfigyelt antiallodyniás hatás közvetlen antinociceptív hatás vagy a gyulladásgátló hatás másodlagos következménye-e. Bár az antinociceptív hatás mellett szólt, hogy altatott patkányban a decentralizált nociceptorok izgatása gátolta a nocifenzív kardiovaszkuláris reflexet (Helyes *et al.*, 2000), direkt bizonyíték nem állt rendelkezésre.

A perifériás nociceptorok izgatásakor akciós potenciálok sorozata jut be a központi idegrendszerbe (ún. nociceptív input), ami nemcsak fájdalomérzet kialakulásához vezethet, hanem ellenregulációs, antinociceptív mechanizmusokat is aktiválhat. Ezek közé tartoznak a(z) (i) leszálló gátló (antinociceptív) pályák, amelyek különböző középagy magokból (pl. periaqueductalis szürkeállomány) kiindulva a hátsó szarvban végződnek, és ott gátolják a nociceptív transzmissziót (a részleteket illetően lásd Ossipov *et al.*, 2010); (ii) „diffuse noxious inhibitory controls” (DNIC), amelynek szubsztrátuma egy szupraspinális (nyúltvelői) hurok közbeiktatásával szintén a hátsó szarvban végződő pálya (Le Bars, 2002); (iii) szegmentális és más antinociceptív ideghálózatok, amelyek a nucleus accumbens (Gear *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 2010) vagy hátsógyökér-reflexeket (Willis, 1999; Carlton *et al.*, 2003; Carlton, 2014) foglalnak magukba.

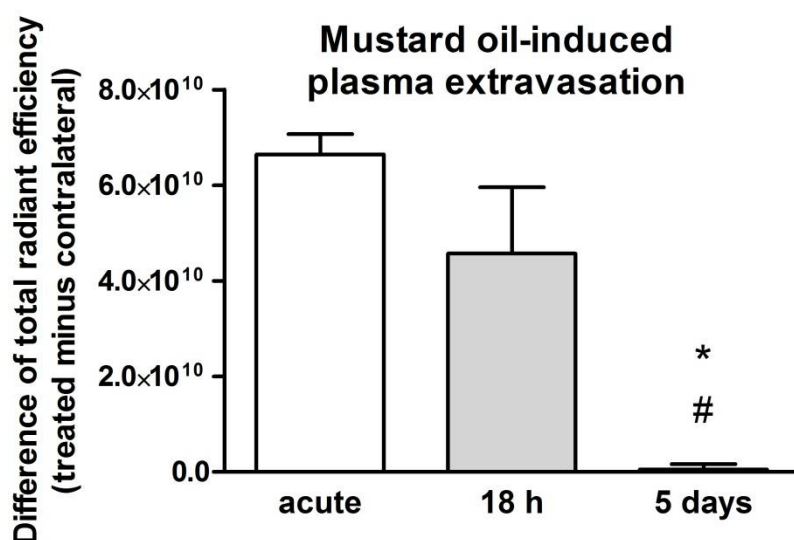
A fentiek alapján célunk az volt, hogy egy hasonló kísérletes elrendezésben, mint amelyben a távoli, szomatosztatin által közvetített gyulladásgátló hatást korábban sikerült kimutatni, megvizsgáljuk annak lehetőségét, hogy a „szenzokrin” hatás részeként direkt antiallodyniás hatás fellép-e, ha a centrális ellenregulációs (antinociceptív) mechanizmusokat a stimulált testrész denervációjával az esetleges antiallodyniás hatás indukciójából kizárjuk.

5.5.2. A távoli antiallodyniás hatás vizsgálatának elvi sémája

Az alkalmazott kísérletes modell nagymértékben hasonló volt ahhoz, mint amelyben korábban a nociceptorstimulációval kiváltott távoli gyulladásgátló hatás vizsgálata történt (Szolcsányi *et al.*, 1998a, 1998b). Patkányok jobb hátsó lábának idegátmetszéssel decentralizált (központi idegrendszeri kapcsolatától megfosztott) nociceptorait ingereltük intraplantárisan adott kapszaicinnal vagy perkután alkalmazott mustárolajjal, és az ellenoldali lábon – előzetesen elvégzett – standardizált plantáris bemetszéssel kiváltott nociceptív hőküszöbcsökkenést mértük (68. ábra). Egy kísérletsorozat erejéig a nociceptorizgatást követően a részleges n. ischiadicus lekötéssel kiváltott mechanonociceptív küszöbcsökkenést vizsgáltuk az ellenoldali lábon. Hangsúlyozandó, hogy a kémiai ingerelt jobb lábon 18 órával korábban mind a n. saphenust, mind a n. ischiadicust átvágtuk ugyanabban az altatási ciklusban, mint amelyben a plantáris incíziót végeztük az ellenoldalon. Erre azért volt szükség, hogy az ingerelt nociceptoraiból ne jusson be akciós potenciálok formájában a központi idegrendszerbe idegi aktivitás, ami bármiféle ellenregulációs, antinociceptív reakciót (lásd fent) tudna kiváltani, megakadályozva a szenzokrin mechanizmus indukciójának izolált vizsgálatát. A 18 órás várakozást az indokolta, hogy ennyi idő volt szükséges ahhoz, hogy a pentobarbital-narkózis magatartási utóhatásai elmúljanak. A további metodikai részleteket lásd az 5.1. pontban.



68. ábra. A decentralizált nociceptorok kémiai izgatásával kiváltott távoli termális antiallodyniás hatás vizsgálatára alkalmazott kísérletes elrendezés éber patkányban. A részleteket lásd a szövegben.



69. ábra. 5 %-os mustárolajjal kiváltott és ICG-fluoreszcenciával mért plazma-extravazáció patkány hátsó lábán akutan, 18 órával, illetve 5 nappal az idegátmetszés (n. saphenus és ischiadicus) után. Az oszlopok átlag±SEM értékeket mutatnak, amelyeket a kezelt és az ellenoldali lábban mért fluoreszcencia különbségeként nyertünk (n=5–5). A statisztikai analízishez egyszempontos ANOVA-t követő Newman–Keuls-tesztet használtunk (* p<0,01 az akut idegátmetszéshez viszonyítva, # p<0,01 a 18 órás idegátmetszéshez viszonyítva).

5.5.3. Eredmények és megbeszélés

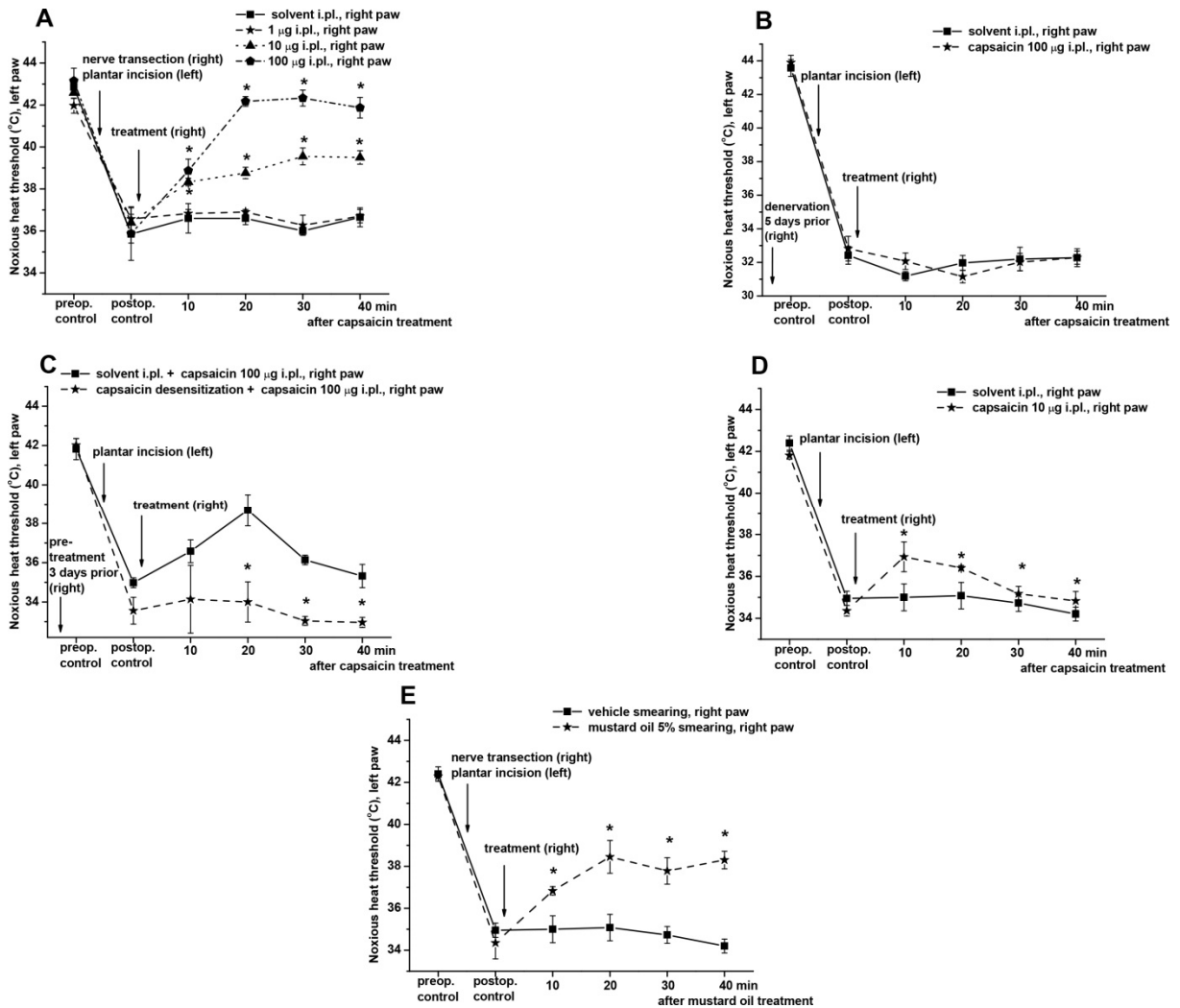
Az akut, a 18 órás, illetve az 5 napos denerváció hatása a mustárolajjal kiváltott plazma-extravazációra patkány hátsó lábán

A fluoreszcenciamérési vizsgálatok azt igazolták, hogy 18 órával az idegátmetszés után (szubakut denerváció) mintegy 31%-kal, statisztikailag nem szignifikáns módon (p=0,12)

csökkent a perkután alkalmazott mustárolajjal kiváltott plazma-extravazáció a patkány hátsó lábán (**69. ábra**). Ez arra utal, hogy ennyi idő elteltével az axotómia után nem változik érdemben a peptiderg polimodális nociceptorok neuropeptid-kibocsátó képessége. Ezzel szemben 5 nappal az idegátmetszés után (krónikus denerváció) érdemleges plazma-extravazáció nem volt mérhető (**69. ábra**), ami annak tudható be, hogy ennyi idő alatt már degenerálódnak az idegvégződések. Mindezek alapján megállapítható, hogy a modellünkben alkalmazott 18 órás idegátmetszés nem okozott szisztémás hibát az eredmények analízisében (egy esetleges extravazáció-fokozódás esetén nem lehetett volna kizárni, hogy a „pusztulófélben” levő decentralizált idegvégződések patológiásan fokozott neuropeptid-kibocsátása miatt a kísérleti paradigmánk élettanilag irreleváns). Eredményeink összhangban vannak azzal, hogy patkány kötőhártyáján 24 órával az idegátmetszés után a kapszaicinnal kiváltott plazma-extravazáció változatlan maradt (Jancsó *et al.*, 1967).

Az idegátmetszett láb kémiai stimulációjával kiváltott távoli termális antiallodyniás hatás és annak neuronális háttere

A 18 órával korábban idegátmetszett hátsó láb talpbőre alá injektált kapszaicin (10–100 µg) nem váltott ki semmiféle nocifenzív reakciót, de szignifikánsan csökkentette – a szolvenséhez képest – az ellenoldali hátsó lábon 18 órával korábban ugyanazon műtéti ülésben elvégzett plantáris incízióval kiváltott nociceptív hőküszöbcsökkenést (**70. ábra, A panel**). Ez a távoli termális antiallodyniás hatás a középső és a legmagasabb dózis esetében mind a négy mérési időpontban statisztikailag szignifikáns volt. A hatás dózisfüggőnek mutatkozott, és a legmagasabb alkalmazott adag csaknem megszüntette az allodyniát, hasonlóan az incíziós modellben korábban vizsgált 3 mg/kg morfinhoz (lásd 4.5.3. pont). Ez azt jelzi, hogy a kapszaicin távoli antiallodyniás hatása a morfinéval egyenértékű. Hasonló, mind a 4 mérési időpontban szignifikáns ellenoldali antiallodyniás hatást fejtett ki az idegátmetszett láb bőrére kent 5%-os mustárolaj, amelyet a polimodális nociceptorokban a TRPV1-gyel koexpresszáldó TRPA1-ioncsatorna aktivátorának tartanak (Story *et al.*, 2003; Bandell *et al.*, 2004; **70. ábra E panel**). Ez azt jelenti, hogy a decentralizált nociceptorok aktiválásának módja (TRPV1 *versus* TRPA1) nem releváns az antiallodyniás hatás indukciója szempontjából. A hatás mindkét irritáns esetében már 10–20 perccel az alkalmazás után kimutatható volt, ami valószínűtlenné teszi, hogy egy primer gyulladásgátló hatás másodlagos következményéről lenne szó, hiszen ennyi idő alatt számottevő gyulladáscsökkentő effektus valószínűsíthetően nem tud kifejlődni.



70. ábra. Az idegátmetszett hátsó láb kémiai izgatásával kiváltott távoli termális antiallodyniás hatás és annak közvetítő idegelemei. Az idegátmetszett lábba intraplantárisan (i.pl.) adott kapszaicin, illetve szolvensének (**A panel**) vagy a perkután alkalmazott mustárolaj, illetve szolvensének (**E panel**) hatása az ellenoldali, incindált lábon mért nociceptív hőküszöbre. **B panel:** krónikusan denervált (5 nappal az idegátmetszés után) lábba adott kapszaicin vagy szolvensének hatása az ellenoldali, incindált lábon mért nociceptív hőküszöbre. **C panel:** intraplantárisan adott kapszaicin hatása az ellenoldali, incindált lábon mért nociceptív hőküszöbre kapszaicinnal vagy annak szolvensével történt helyi előkezelést (3 nappal korábban) követően. **D panel:** az intakt beidégzésű lábba adott kapszaicin, illetve szolvensének hatása az ellenoldali, incindált lábon mért nociceptív hőküszöbre. Mindegyik panel esetében a preoperatív kontroll az incízió előtt, a posztoperatív kontroll az az után 18 órával mért nociceptív hőküszöböt jelenti. Az idegátmetszés és az incízió, valamint a kémiai ágenssel történő kezelés hozzátétőlegesen idejét nyíl jelzi. Az oszlopok 8–12 állatból nyert átlag±SEM értékek. A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérő küszöbcsökkenéseket (a preoperatív kontrollhoz viszonyítva) jeleznek a szolvenssel kezelt csoporthoz képest (kétszemponos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt).

Krónikus denerváció esetében (5 nappal az idegátmetszés után) a talpba adott legmagasabb kapszaicindózis (100 µg) nem váltott ki semmiféle nocifenzív reakciót, és az ellenoldali láb hőküszöbe sem különbözött szignifikánsan a szolvenssel kezeltétől, jelezve, hogy nem alakult ki termális antiallodyniás hatás (**70. ábra, B panel**). Ez azt bizonyítja, hogy a 18 órával az idegátmetszés után alkalmazott kapszaicin hatása a talp területén található idegelemek

izgatása révén jön létre. Ez az eredmény nem meglepő, de abból a szempontból fontos, hogy kizárja azt a lehetőséget, hogy nem-neuronális lokalizációjú, hám- vagy immunsejteken elhelyezkedő TRPV1-receptorok izgatása révén jönné létre a kapszaicin ezen hatása (a részleteket illetően lásd Nilius és Szállási, 2014).

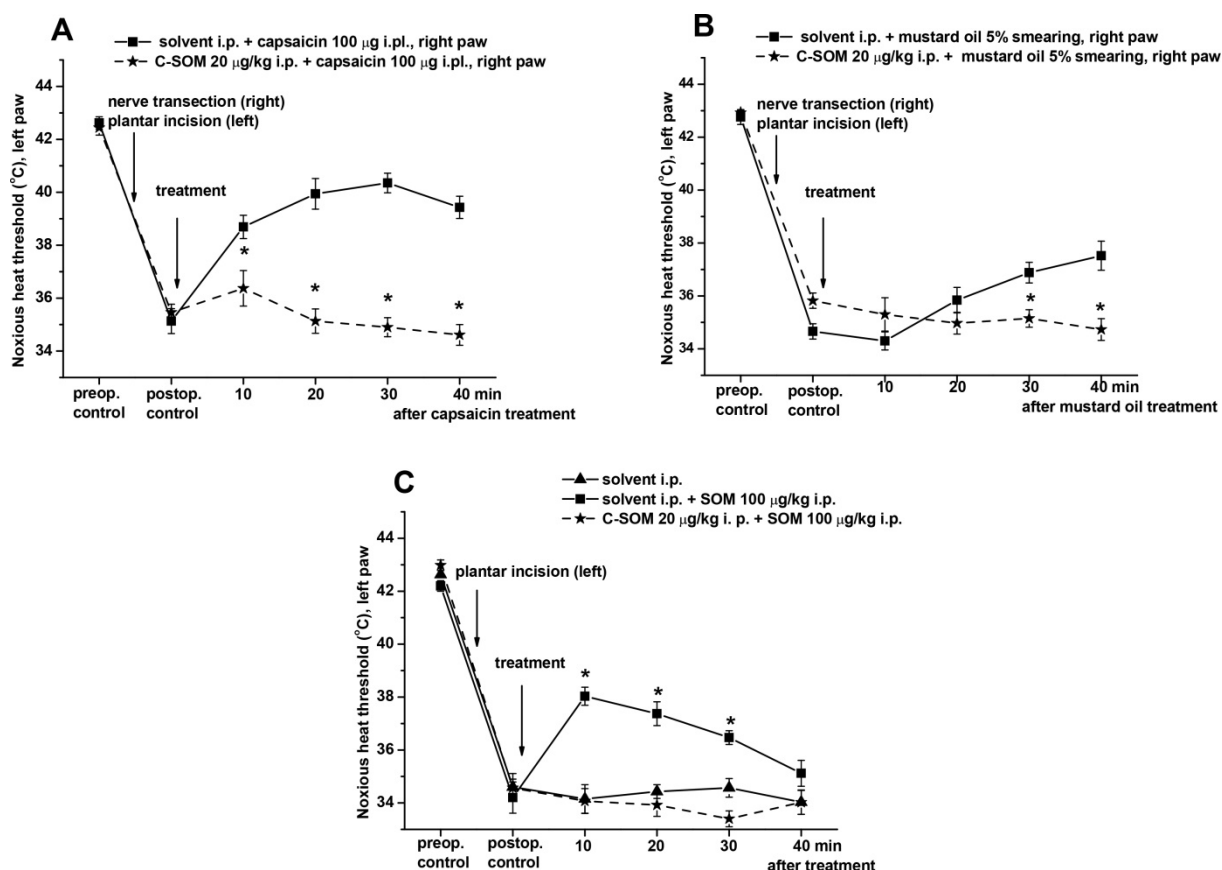
Ismert, hogy a kapszaicin magasabb koncentrációi hosszabb idő alatt a TRPV1-et expresszáló idegvégződésekből olyan, akár degenerációig terjedő elváltozásokat (idegvégződés-szintű deszenzibilizáció) okoznak, amelyek ezen idegelemek működésének nagyfokú gátlását eredményezik mindenfajta stimulussal szemben (lásd 1.4.1.5. pont). A legmagasabb kapszaicindózis nem váltott ki sem nocifenzív reakciót az injektált lábon, sem antiallodyniás hatást az ellenoldali lábon abban az esetben, amikor 3 nappal korábban a talp területén ugyanekkora dózissal deszenzibilizációt hoztunk létre, de nem végeztünk idegátmetszést (**70. ábra, C panel**): a kapszaicin hatására nem emelkedett meg az ellenoldali láb nociceptív hőküszöbe a posztoperatív kontroll érték fölé, szemben a szolvenssel előkezelt állatokkal (amelyekben a beadás után átmenetileg a kapszaicinnal kezelt láb nyalása és rázása volt megfigyelhető). Így ez az eredmény megerősíti azt az amúgy kézenfekvő feltételezést, hogy a távoli antiallodyniás hatásért a kapszaicinérzékeny, azaz TRPV1-et expresszáló nociceptorok izgatása felelős. A kapszaicin hatástalansága mind a krónikus denerváció, mind a kapszaicin-deszenzibilizáció esetében arra is enged következtetni, hogy a talpba adott szer hatása lokális stimuláció eredménye, és nem annak a következménye, hogy a szer felszívódik a talpból, és a keringéssel a test valamely részébe eljutva fejti ki az antiallodyniás hatást pl. nociceptor-deszenzibilizáció vagy központi idegrendszeri ellenreguláció (lásd korábban) kiváltása révén.

Az idegátmetszés kísérleti paradigmánk egyik fontos pillére volt: segítségével tudtuk kizárni az esetleges ellenregulációs antinociceptív mechanizmusok szerepét az antiallodyniás hatás indukciójában. Ugyanakkor ez a művelet nyilvánvalóan egy rendellenes helyzetet teremtett. Minthogy a kapszaicin és a mustárolaj hatását mindig a szolvensével hasonlítottuk össze, és mind a szolvenssel, mind a szerrel történő kezelés egyaránt idegátmetszett állatokban történt, az axotómia mint szisztémás hiba kizárható. Ennek ellenére egy kísérletsorozatban megvizsgáltuk, hogy intakt innerváció mellett reprodukálható-e a távoli antiallodyniás hatás. A kisebb hatékony kapszaicindózis (10 µg) nem idegátmetszett állatokban kb. 5 percig tartó nocifenzív reakciót váltott ki (láb nyalása és rázása), és ezt követően mérsékelte az ellenoldali lábon az incízióval kiváltott hőküszöbcsökkenést a szolvenséhez viszonyítva. Ez a hatás mind a négy mérési időpontban szignifikáns volt (**70. ábra, D panel**), igazolva, hogy az axotómia nem *sin equa non*-ja a távoli antiallodyniás hatásnak. Nagyobb kapszaicinadagot etikai okokból nem teszteltünk. Megemlítendő, hogy az intakt innervációjú állatokban a 10 µg kapszaicin kisebb

mértékű antiallodyniás hatást váltott ki, mint az idegátmetszettekben (**70. ábra, A panel**). Azonban a két hatás direkt összehasonlítása félrevezető lenne, hiszen az intakt innervációjú állatokban kialakuló nocifenzió, stressz, kortikoszteroid-mobilizáció stb. mind olyan faktorok, amelyek kizárják annak megbízható megítélését, hogy a nociceptív input hatására kialakul-e, és ha igen, milyen mértékben centrális ellenreguláció.

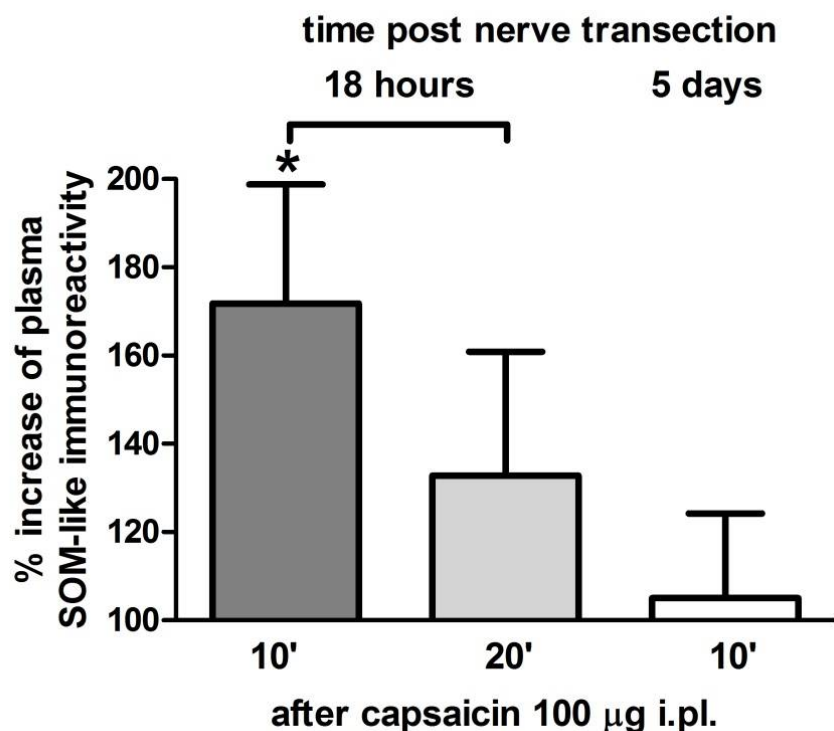
Az idegátmetszett láb kémiai stimulációjával kiváltott távoli termális antiallodyniás hatás mediátorai

A szisztémásan adott cikloszomatosztatin (C-SOM, 20 µg/kg i.p.), amely a szomatosztatinreceptoroknak mind az öt altípusát (sst1–5 receptorok) gátolja (Carlton *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2008; Helyes *et al.*, 2004) jelentősen mérsékelte a 20 perccel később alkalmazott kapszaicinnel vagy mustárolajjal kiváltott távoli termális antiallodyniás hatást (**71. ábra, A panel**). Az antagonistá majdnem teljesen kivédte a kapszaicin hőküszöbemelő hatását, és a hatása a szolvenséhez képest minden mérési időpontban szignifikáns eltérést mutatott. A C-SOM-előkezelés a mustárolajjal kiváltott távoli termális antiallodyniás hatást is gátolta, a hatása azonban csak a 30. és 40. percben volt szignifikáns a szolvenséhez képest (**71. ábra, B panel**). Idegátmetszésen nem, de plantáris incízió után átesett állatokban a kívülről bevitt, szisztémásan adott szomatosztatin (100 µg/kg i.p.) gátolta a bemetszett lábon kialakuló hőküszöbcsökkenést a 10–30 perces periódusban (**71. ábra, C panel**), utánozva a kapszaicin és a mustárolaj idegátmetszett patkányokban mutatott antiallodyniás hatását. C-SOM-előkezelést (20 µg/kg i.p., 20 perccel korábban) követően a szomatosztatin nem tudta megemelni a hőküszöböt a 10–30 perces periódusban, azaz nem volt képes antiallodyniás hatást kiváltani (**71. ábra, C panel**), ami igazolja a C-SOM receptorblokkoló képességét a modellünkben. Tizennyolc órával az idegátmetszés és a plantáris incízió után a jobb talpba adott kapszaicin (100 µg) szignifikáns mértékben ($p < 0,01$), $71,8 \pm 27,0\%$ -kal megnövelte a plazma szomatosztatinszerű immunreaktivitását a 10. percben mérve (**72. ábra**). Ezt követően a 20. percben már csak egy nem szignifikáns ($p = 0,16$), reziduális $32,7 \pm 28,1\%$ -os fokozódás volt mérhető. A fenti eredmények egyértelműen igazolják a szomatosztatin közvetítő szerepét a decentralizált nociceptorok izgatásával kiváltott távoli antiallodyniás hatásban. Megjegyzendő, hogy a plazma szomatosztatinszerű immunreaktivitása 4-szeresére nőtt patkányban a n. ischiadicusok 5 perces bilaterális antidrómos elektromos ingerlése után 2 perccel (Szolcsányi *et al.*, 1998a). Krónikus deréktáji fájdalomban szenvedő betegekben kapszaicinderivátumot tartalmazó krémmel történő naponkénti kezelés analgetikus hatást eredményezett, és az első kezelés után 3-szorosára nőtt a plazma szomatosztatinszerű immunreaktivitása (Horváth *et al.*, 2014).



71. ábra. A szomatosztatin (SOM) szerepe az idegátmetszett láb kémiai izgatásával kiváltott távoli termális antiallodyniás hatásban. Az idegátmetszett lábba intraplantárisan (i.pl.) adott kapszaicin (**A panel**), illetve perkután alkalmazott mustárolaj (**B panel**) hatása az ellenoldali, incidált lábon mért nociceptív hőküszöbre a szomatosztatin-antagonista cikloszomatosztatinnal (C-SOM) vagy annak szolvensével történt intraperitoneális (i.p.) előkezelést (20 perccel korábban) követően. A „kezelés” nyíl jelöli egyaránt jelöli a szisztémás előkezelést és 20 perccel később az irritáns adását. **C panel:** kívülről bevitt SOM hatása az incidált lábon mért nociceptív hőküszöbre (a szolvenséhez viszonyítva) intakt beidegzésű állatokban C-SOM hiányában, illetve jelenlétében. A „kezelés” nyíl jelöli egyaránt a C-SOM-mal vagy szolvensével történt előkezelést és 20 perccel később a SOM adását. Mind a SOM, mind a C-SOM szolvense fizioológias sóoldat volt. Mindegyik panel esetében a preoperatív kontroll az incízió előtt, a posztoperatív kontroll az az után 18 órával mért nociceptív hőküszöböt jelenti. Az idegátmetszés és az incízió, valamint a kémiai ágenssel történő kezelés hozzátétőleges idejét nyíl jelzi. Az oszlopok 8–12 állatból nyert átlag \pm SEM értékek. A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérő küszöbcsökkenéseket (a preoperatív kontrollhoz viszonyítva) jeleznek a szolvenssel kezelt csoporthoz képest (kétszemponos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt).

Az a tény, hogy 5 nappal az idegátmetszés után (krónikus denerváció) a kapszaicin i.pl. injekciója nem váltott ki érdemleges növekedést a plazma szomatosztatinszerű immunreaktivitásában 10 perccel a beadás után mérve ($5,0 \pm 19,2$ %, $p = 0,79$, **72. ábra**) azt mutatja, hogy a többlet-szomatosztatin forrása a plazmában neuronális eredetű, vagyis a kapszaicinnal stimulált láb peptiderg nociceptoraiból származik.



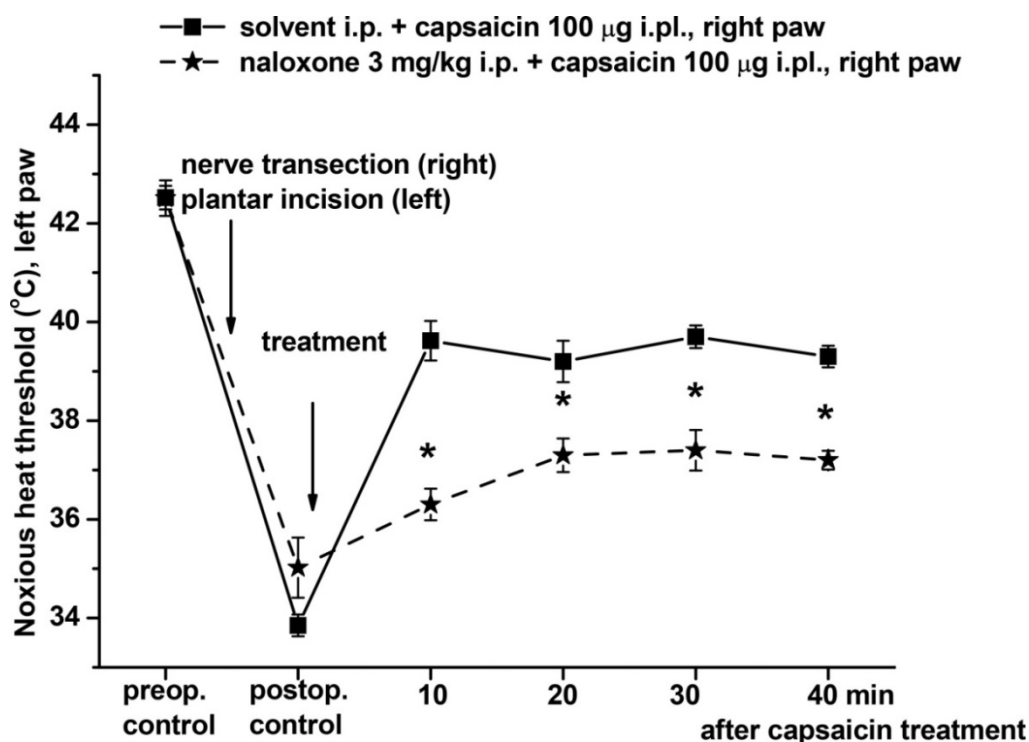
72. ábra. Az idegátmetszett lábba intraplantárisan (i.pl.) adott kapszaicin hatása a plazma szomatosztatinszerű immunreaktivására idegátmetszésen és plantáris incízió után átesett patkányokban. Vérminta vétele a kapszaicin adása utáni 10. és 20. percben történt a 18 órás idegátmetszés esetében és a 10 percben a krónikus (5 nap) denerváció esetében. A plazma szomatosztatinszerű immunreaktivitásának százalékos növekedését az alábbi képlettel számoltuk: $(\text{átlagérték kapszaicinstimulációval} - \text{átlagérték szolvensstimulációval}) / \text{átlagérték szolvensstimulációval} \times 100$. Az oszlopok 7–8 állatból nyert átlag \pm SEM értékek. A csillag statisztikailag szignifikánsan ($p < 0,01$) eltérő értéket jelez a megfelelő szolvenskezelte csoporthoz viszonyítva (nincs mutatva) a Student-féle kétmintás t-próbával vizsgálva.

A fentiekkel összhangban a szomatosztatinról ismert, hogy nemcsak centrális, hanem perifériás támadásponttal is képes antinociceptív/analgetikus hatások kiváltására (Carlton *et al.*, 2001a; 2001b; Carlton *et al.*, 2003; Corsi *et al.*, 1997; Heppelmann és Pawlak 1997; Ji *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2014; Matucci-Cerinic and Marabini, 1998; Silveri *et al.*, 1994; Schuelert *et al.*, 2015). Modellünkben a szomatosztatin legvalószínűbb forrását a primer afferens neuronok perifériás végződéseinek képezzik (Lawson, 1995), ahol mind a P-anyaggal kolokalizációban (Kashiba *et al.*, 1996), mind külön alpopulációban (Höckfelt *et al.*, 1976) kimutatták, és a felszabadulására is van bizonyíték (Malcangio, 2003). A szomatosztatint expresszáló szenzoros rostpopuláció nem elhanyagolható méretű: patkány hátsó lábában a bőr C afferenseinek 20 %-a tartalmaz szomatosztatint, 50 %-a CGRP-t és 27 %-a P-anyagot (Lawson, 1996). Meglepő módon RTX i.v. injekciója patkányban nagyobb mértékben fokozta a plazma szomatosztatinszintjét, mint a CGRP-ét (Helyes *et al.*, 2003). Mivel nagy valószínűséggel a szomatosztatin nem képes bejutni a központi idegrendszerbe (Meisenberg és Simmons, 1983), modellünkben az antiallodyniás hatásának legvalószínűbb támadáspontját azok a sst-receptorok

jelentik, amelyek expresszióját igazolták a perifériás nociceptorokon (Carlton *et al.*, 2001a; Guo *et al.*, 2008). Mind a TRPV1, mind a TRPA1 nem-szelektív kationcsatorna, amelyen keresztül Ca^{2+} tud beáramlani az idegvégződésbe, ami a peptidfelszabadulás közvetlen ingere.

Eredményeink arra utalnak, hogy a plazma szomatosztatinszintjének maximuma és a távoli antiallodyniás hatás maximuma időben nem esik egybe: előbbi a kapszaicinadás utáni 10 perc körüli időszakra tehető (20 percnél biztosan kevesebb), míg utóbbi a 20–30 perc közötti periódusban van. Ez nem ellentmondás, ha figyelembe vesszük, hogy a szomatosztatin támadáspontja nem az érpályán belül van, hanem vélhetően az incindált talp epidermális és dermális szövetében levő nociceptív idegvégződéseken. Feltételezhető, hogy a 14 (28) aminosavból álló szomatosztatinnak a plazmából a célszövetbe történő transzportja során különféle diffúziós barrieréken kell áthaladnia, amelyek késleltetik a célszöveti akkumulációját. Ez eredményezheti azt, hogy amikor a plazmaszint maximális (10 perc körül), még alacsony a célszöveti koncentráció és kicsi az antiallodyniás hatás. 20 percnél már alacsony a plazmaszint (a szomatosztatin 2–3 perces felezési ideje miatt; Harris, 1994; Werle and Bernkop-Schnürch, 2006), de az ekkor tetőző szöveti szint maximális hatást vált ki.

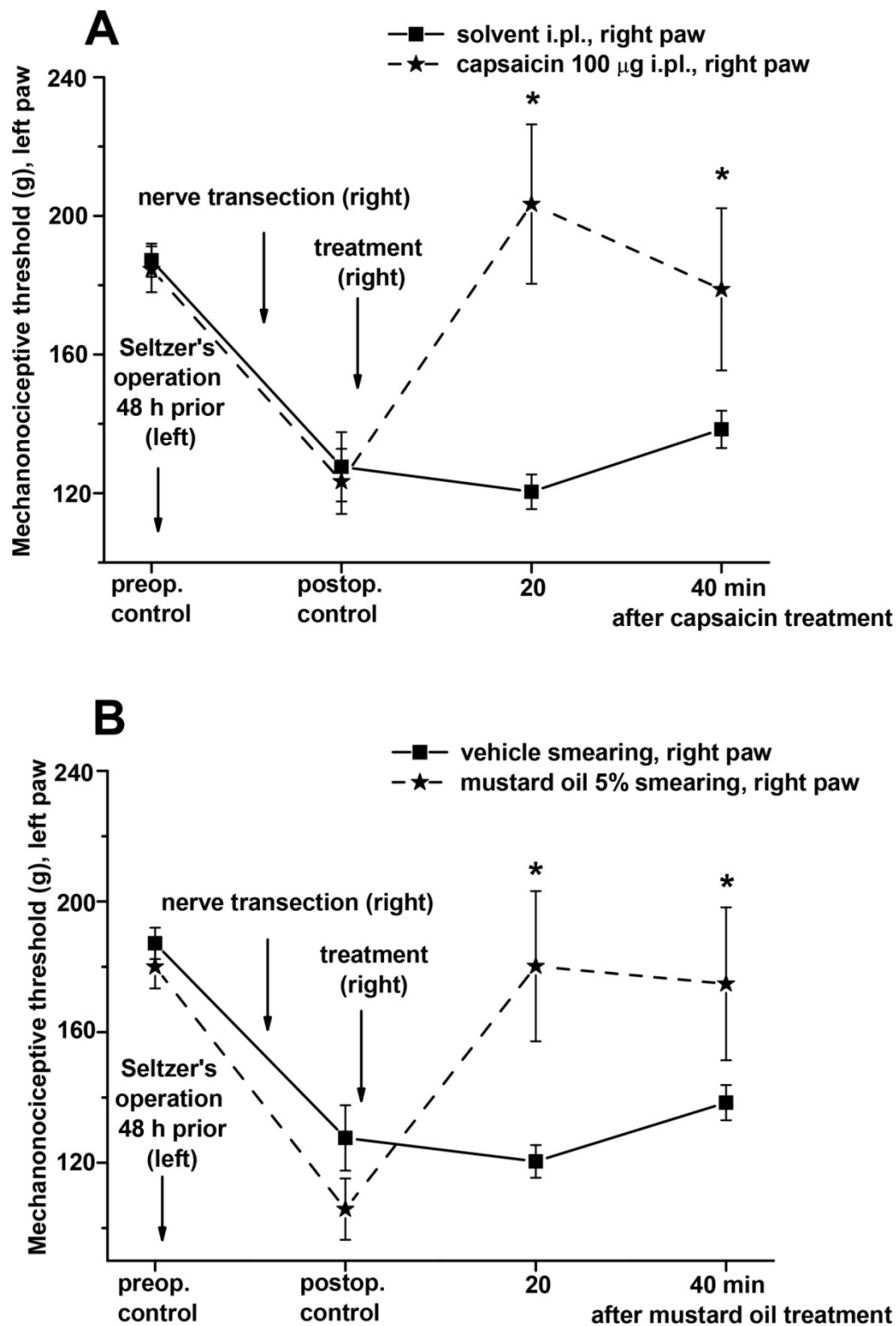
A nem altípus-szelektív ópioidreceptor-antagonista naloxonnal történt előkezelés (3 mg/kg i.p.) mérsékelte a 20 perccel később alkalmazott kapszaicinnal kiváltott távoli termális antiallodyniás hatást, szignifikánsan csökkentve az ellenoldali lábon mért hőküszöböt a szolvenshez viszonyítva mind a négy mérési időpontban (**73. ábra**). A naloxon távoli antiallodyniás hatást gátló aktivitása alapján arra következtethetünk, hogy endogén ópioidok is részt vesznek a folyamat közvetítésében. Az ópioidok forrásának és támadáspontjának felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek. Mindazonáltal hangsúlyozandó, hogy dinorfinok, enkefalinok és endomorfink expresszióját egyaránt kimutatták primer afferens neuronokban, illetve az endomorfín-3 és P-anyag kolokalizációjára is van bizonyíték (Stein *et al.*, 2009; Sanderson Nydahl *et al.*, 2004). Továbbá patkány hátsó lábában a bőr nem-mielinizált szenzoros rostjainak 17 %-a tartalmaz met-enkephalint (Carlton és Coggeshall, 1997). Egy másik lehetőség, hogy az ópioid peptidek leukocitákból szabadulnak fel (Rittner *et al.*, 2001; 2006), amelyeket a kapszaicin és a mustárolaj keltette neurogén gyulladás aktivál. Egy lehetséges szcenárió szerint az ópioid peptidek – a szomatosztatinhoz hasonlóan – a stimulált nociceptorokból és/vagy leukocitákból szabadulnak fel, majd bejutnak a plazmába, és a keringéssel eljutnak az ellenoldali lábba, ahol a nociceptorokon levő ópioidreceptorok (Stein *et al.*, 2009) izgatásával fejtenek ki antiallodyniás hatást. Tekintettel arra, hogy bizonyos ópioid peptidek pl. az enkefalinok képesek átlépni a vér–agy gáton (Banks és Kastin, 1990), az ópioidok esetleges centrális hatáskomponense nem zárható ki.



73. ábra. Az endogén opioidok szerepe az idegátmetszett láb kémiai izgatásával kiváltott távoli termális antiallodyniás hatásban. Az idegátmetszett lábba intraplantárisan (i.pl.) adott kapszaicin hatása az ellenoldali, incidált lábon mért nociceptív hőküszöbre az opioidreceptor-antagonista naloxonnal vagy szolvensével történt intraperitoneális (i.p.) előkezelést (20 perccel korábban) követően. A „kezelés” nyíl jelöli egyaránt jelöli a szisztémás előkezelést és 20 perccel később a kapszaicin adását. Mindegyik panel esetében a preoperatív kontroll az incízió előtt, a posztoperatív kontroll az az után 18 órával mért nociceptív hőküszöböt jelenti. Az idegátmetszés és az incízió, valamint a kémiai ágenssel történő kezelés hozzávetőleges idejét nyíl jelzi. Az oszlopok 8–12 állatból nyert átlag±SEM értékek. A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérő küszöbcsökkenéseket (a preoperatív kontrollhoz viszonyítva) jeleznek a szolvenssel kezelt csoporthoz képest (kétszemponos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt).

Az idegátmetszett láb kémiai stimulációjával kiváltott távoli mechanikai antiallodyniás hatás

Az idegátmetszés után 18 órával intraplantárisan adott kapszaicin (**74. ábra, A panel**), illetve perkután alkalmazott mustárolaj (**74. ábra, B panel**) szignifikánsan csökkentette az ellenoldali lábon a parciális ideglekötéssel (az idegátmetszés előtt 48 órával korábban végzett Seltzer-műtét; Seltzer *et al.*, 1990) kiváltott mechanonociceptív küszöbcsökkenést (mechanikai allodynia) mindkét mérési időpontban. Mindkét stimuláló ágens gátló hatása a mechanikai allodyniára közel teljes volt. Mindez azt jelenti, hogy a decentralizált nociceptorok kémiai izgatásával kiváltott távoli antinociceptív hatás nemcsak a bemetszéssel kiváltott termális allodynia ellen hatékony, hanem a neuropátiás mechanizmusú mechanikai allodynia ellen is.



74. ábra. Az idegátmetszett lábba intraplantárisan (i.pl.) adott kapszaicin, illetve szolvensének (**A panel**) valamint a perkután alkalmazott mustárolaj, illetve szolvensének (**B panel**) hatása az ellenoldali, előzetes parciális n. ischiadicus-lekötésen (Seltzer-műtét, 2 nappal az idegátmetszés előtt) átesett lábon mért mechanonociceptív küszöbre. Mindkét panel esetében a preoperatív kontroll a Seltzer műtét előtt, a posztoperatív kontroll az idegátmetszés után 18 órával mért mechanonociceptív küszöböt jelenti. A Seltzer műtét és az idegátmetszés, valamint a kémiai ágenssel történő kezelés hozzávetőleges idejét nyíl jelzi. Az oszlopok 8–12 állatból nyert átlag \pm SEM értékek. A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérő küszöbcsökkenéseket (a preoperatív kontrollhoz viszonyítva) jeleznek a szolvenssel kezelt csoporthoz képest (kétszemponos ANOVA utáni Newman-Keuls-teszt).

A kimutatott távoli antiallodyniás hatás koncepcionális jelentősége

Hasonló kísérletes elrendezésben, mint amelyben Szolcsányi és Pintér a nociceptorok izgatásával kiváltott távoli, szomatosztatin-közvetítette gyulladásgátló hatást mutatott ki altatott patkányban és tengerimalacban (1998a; 1998b), sikerült igazolni, hogy a hátsó láb decentralizált nocieptorainak kémiai izgatása éber patkányban távoli (kontralaterális), termális antiallodyniás hatást fejt ki. Ennek közvetítésében a szomatosztatin mellett endogén opioidok is részt vesznek. Tekintettel arra, hogy az antiallodyniás hatás mind a plantáris bemetszéssel kiváltott termális, mind a parciális ideglekötéssel keltett mechanikai hiperalgéria gátlását eredményezte, a feltárt távoli antinociceptív hatás széles spektrumúnak minősíthető az ingerlési modalitás (termális *versus* mechanikai), illetve a kialakulási mechanizmus (döntően gyulladásos *versus* idegsérülésen alapuló) tekintetében egyaránt. Ezen túlmenően a távoli hatás robusztus, mivel mind az incízióval keltett termális, mind az idegsérülés okozta mechanikai hiperalgéria közel teljes gátlását eredményezte, illetve a kapszaicinnal kiváltott termális antiallodyniás hatás 3 mg/kg morfin hasonló hatásával bizonyult ekvivalensnek. Ezek a jellegzetességek egyértelműen jelzik a távoli antiallodyniás hatás élettani/kórélettani jelentőségét.

Eredményeink alapján az a következtetés is levonható, hogy a peptiderg perifériás nociceptorok Pintér és Szolcsányi által leírt harmadik, „szenzokrin” funkciója (Pintér *et al.*, 2006; Szolcsányi *et al.*, 2011) nemcsak gyulladásgátló, hanem antinociceptív, közelebbről antiallodyniás hatást is magába foglal. Tekintettel arra, hogy számos fájdalommal járó kórállapotban kisebb-nagyobb gyulladásos komponens is jelen van, e két távoli „szenzokrin” hatás egymást erősítve jelentős mértékben hozzájárulhat a gyulladásos és neuropátiás etiológiájú kórállapotok tüneteinek enyhítéséhez. Regulációs szempontból kiemelendő, hogy eredményeink alapján a perifériás nociceptorok nemcsak a fájdalmas intenzitású ingerek felfogásában (transzdukciójában és akciós potenciállá való transzformációjában) játszanak szerepet, hanem a perifériásan indukálódó szisztémás antiallodyniás hatás mediátorá(ai)nak forrását és valószínű támadáspontját is jelentik egyben.

Eredményeinknek van egy további lényeges és gyakorlati aspektusa. Az ellenirritáció régóta ismert jelenség, amely során a test egyik részének (fájdalmas) ingerlése analgetikus, illetve antiallodyniás hatást eredményez a test más területein (Gammon és Starr, 1941; Melzack, 1975; Bourke, 1985; Roby-Brami *et al.*, 1987; Guieu *et al.*, 1994; Reinert *et al.*, 2000; Carlton *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2010). A humán viszonylatban újabb terminológia szerint „conditional pain modulation”-nak vagy „heterotopic noxious conditioning”-nek nevezett jelenség (Sprenger *et al.*, 2011) hátterében döntő mértékben központi idegrendszeri ellenregulációs (antinociceptív) mechanizmusokat tételeznek fel (a részleteket lásd korábban). A jelen eredmények egy új,

perifériásan iniciálódó mechanizmust kínálnak az ellenirritációval kiváltott analgetikus-antinociceptív hatások magyarázatára: a stimulált perifériás nociceptorokból felszabaduló szomatosztatin a keringéssel eljut a test távoli területeire, ahol a perifériás nociceptorokon levő receptorainak izgatásával antiallodynias/antinociceptív hatást fejt ki. A folyamatban endogén ópoidok szerepe is valószínűsíthető. Amint arra a fentiekben már utaltam, esetleges centrális hatáskomponens nem zárható ki a jelenségben, főleg az ópoid-közvetítette mechanizmus esetében. Mindenesetre a távoli antiallodynias hatás indukciója tisztán perifériásnak tekinthető a kísérleti elrendezésből következően. Ez a perifériás mechanizmus a fentiekben említett centrális folyamatokkal együttműködve, azokat felerősítve vehet részt az ellenirritáció révén kiváltott analgészia folyamataiban.

5.5.4. Fontosabb következtetések

1./ Direkt bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a perifériás nociceptorok izgatása távoli antiallodynias hatást (termális és mechanikai) fejt ki, amelynek indukciója központi idegrendszeri ellenregulációs folyamatoktól független.

2./ A távoli termális antiallodynias hatás közvetítésében igazoltuk a szomatosztatin és az endogén ópoidok szerepét. E mediátorok forrása(i) és támadáspontja(i) nem azonosítható(k) pontosan, de a szomatosztatin az ingerelt nociceptorokból szabadul fel, és valószínűleg a perifériás nociceptív idegvégződéseken fejt ki antiallodynias hatását.

3./ Eredményeink alapján elmondható, hogy a nociceptorok izgatásával kiváltott „szenzokrin” hatás – mint a peptiderg nociceptorok harmadik funkciója – nemcsak a korábban leírt gyulladásgátló mechanizmust foglalja magába, hanem direkt antiallodynias komponenst is involvál. Felvetődik a szerepe az ellenirritációval kiváltott analgetikus/antinociceptív hatásokban.

4./ Konceptcionális szempontból jelentős felfedezés, hogy a perifériás nociceptorok nemcsak a fájdalmas ingerek felfogásában játszanak szerepet, hanem perifériásan indukálódó antiallodynias hatás mediátorának forrását és támadáspontját is jelentik egyben.

5.6. A TRPV1- és a TRPA1-ioncsatornák szerepe egérben a nociceptív hőküszöb meghatározásában és a mustárolajjal kiváltott nociceptív reakciókban

5.6.1. Előzmények és célkitűzések

A bevezetésben említettek alapján patkányban és egérben latenciaidő-mérésen alapuló módszerekkel vizsgálva alacsony ingerintenzitások (véltetően küszöbközelű ingerek) esetében a talp és a fark hőingerrel kiváltott nocifenzív reakciójában a TRPV1-nek nincs számottevő szerepe (1.4.1.4. pont, 1. és 2. táblázat). Ez azt sugallja, hogy a nociceptív hőküszöb meghatározásában a TRPV1 nem játszik lényeges szerepet. Korábbi adatokkal ellentétben a hideg ingerrel aktiválható TRPA1 génjét nélkülöző egerekben latenciaidő-megnyúlást mértek a plantártesztben és hőküszöb-emelkedést a lábhati bőr C polimodális nociceptoraiban (Hoffmann *et al.*, 2013). A TRPA1 esetleges szerepéről a fark nociceptív hőválaszában nem álltak rendelkezésre irodalmi adatok. A fenti adatok fényében célszerűnek láttuk megvizsgálni a TRPV1 és TRPA1 szerepét a forró ingerrel kiváltott nocicepcióban saját fejlesztésű módszereink alkalmazásával, amelyek a tényleges nociceptív hőküszöböt mérik az egér talpán, illetve farkán. Ezenkívül meg kívántuk vizsgálni a TRPV1 és TRPA1 szerepét a fark hideg ingerrel kiváltott nocifenzív válaszában is.

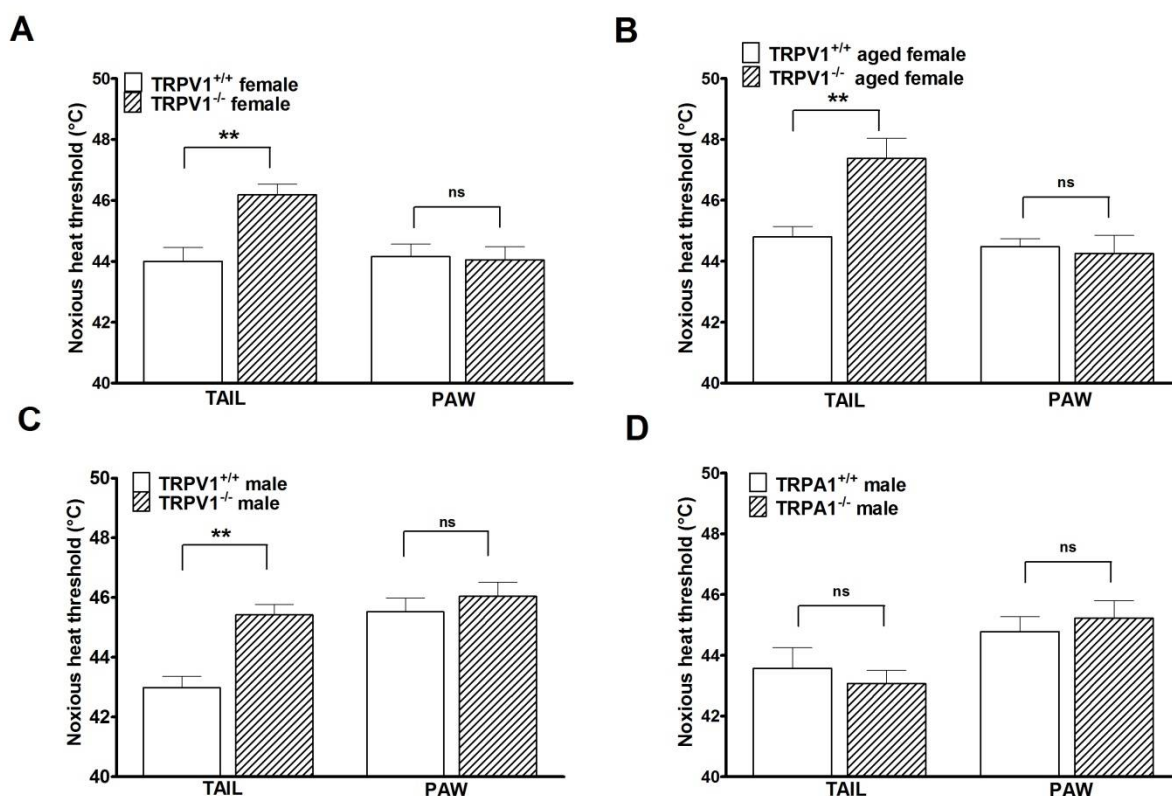
A mustárolaj (allil-izotiocianát, AITC) régóta használt tesztanyag, amely fájdalomkeltő, termális és mechanikai hiperalgéziát kiváltó hatásokkal egyaránt rendelkezik (Reeh *et al.*, 1986; Cleland *et al.*, 1994; Merrill *et al.*, 2008; Koltzenburg *et al.*, 1994; Albin *et al.*, 2008; Koltzenburg *et al.*, 1992b). Az AITC-t korábban mint a TRPA1-csatorna aktivátorát írták le (Jordt *et al.*, 2004; Bandell *et al.*, 2004; Bautista *et al.*, 2006; Kwan *et al.*, 2006), de újabb adatok szerint a TRPV1-et is képes aktiválni, de csak mintegy 100-szor kisebb hatáserősséggel (Ohta *et al.*, 2007; Everaerts *et al.*, 2011; Gees *et al.*, 2013). Célunk volt annak analízise, hogy az AITC-vel kiváltott termális és mechanikai allodyniában, illetve nocifenzív reakcióban milyen szerepet játszanak a TRPV1- és TRPA1-csatornák.

5.6.2. Eredmények és megbeszélés

Az egér farkának, illetve talpának nociceptív hőküszöbe TRPV1- illetve TRPA1-génhiányos egerekben

A farkon mért kiindulási (alap) nociceptív hőküszöb a TRPV1-génhiányos állatokban (mind a fiatal, mind az idősebb nőstényekben, valamint a hímekben) szignifikánsan magasabb volt, mint a nemben és korban megfelelő vad típusúakban (**75. ábra, A, B és C panel**). Ez az

eredmény meglepő, hiszen az 1.4.1.4. pontban említett korábbi adatok arra utaltak, hogy sem a farkon, sem a talpon a küszöbközeli ingerekkel kiváltott termonociceptív válaszbán a TRPV1-nek nincs számottevő szerepe (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2013; Marics *et al.*, 2014). Adataink tehát először szolgáltatnak bizonyítékot arra, hogy az egérfarok tényleges, azaz hőmérséklet formájában mért nociceptív hőküszöbének meghatározásában a TRPV1-csatorna lényeges szerepet játszik. Ez transzlációs szempontból is jelentős, hiszen a TRPV1-antagonisták vizsgálatával kimutatták, hogy a TRPV1 emberben is szerepet játszik a forró ingerek detektálásában (lásd 1.4.1.4. pont).



75. ábra. Az egér farkán (emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel) és hátsó lábának talpán (emelkedő hőmérsékletű forró lappal) mért nociceptív hőküszöb nőstény (A panel), idősebb nőstény (B panel) és hím (C panel) TRPV1-génhiányos állatokban (TRPV1^{-/-}) vad típusú társaikkal összehasonlítva (TRPV1^{+/+}). A D panel hím TRPA1-génhiányos állatok (TRPA1^{-/-}) hőküszöbét mutatja vad típusú társaikkal (TRPA1^{+/+}) összehasonlítva. Az adatok átlag±SEM értékek (n=6–9). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelölnek (**: p<0,01, egyszempontos ANOVA utáni Bonferroni-teszt).

Azon eredményünk, hogy a talpon mért hőküszöb nem volt eltérő a TRPV1-génhiányos állatokban a vad típusúakhoz képest, összhangban áll saját korábbi hőküszöbmérési vizsgálatainkkal (lásd 4.3.3. pont és Bölcskei *et al.*, 2005) és a latenciamérésen alapuló termonociceptív tesztek (forró lap, plantárteszt) eredményeivel (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2013; Marics *et al.*, 2014). Egyben arra utal, hogy a talpon más hőérzékeny csatornák felelősek a nociceptív hőküszöb meghatározásáért. A TRPV1-

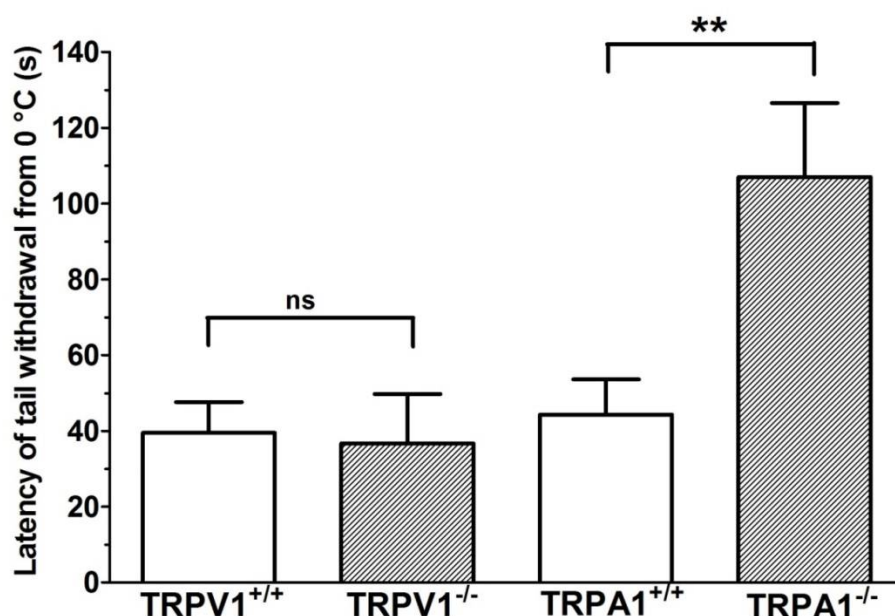
en kívüli hőérzékeny csatornák (TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPM3, ANO1) közül az aktivációs küszöb és a génhiányos egerek termonociceptív tesztekben (forró lap, plantárteszt) mutatott fenotípusa alapján azonban egyik sem tűnik valószínűsíthető jelöltnek (Caterina *et al.*, 1999; Peier *et al.*, 2002a; Güler *et al.*, 2002; Vriens *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2012). Ebből arra kell következtetni, hogy egyéb, még nem azonosított csatorna(ák) felelős(ek) a nociceptív hőküszöb meghatározásáért és/vagy ezen élettani paraméter molekuláris determinációja redundáns: az egyik küszöbmeghatározó ioncsatorna kiesése esetén a többi működése még elégséges az eredeti küszöb fenntartásához. A fark és a talp közötti különbség a TRPV1 eltérő szerepét illetően feltételezhetően arra vezethető vissza, hogy a fark esetében az említett redundancia nem áll fenn. Érdekes megemlíteni, hogy a TRPM3-csatornával kapcsolatban hasonló eredmények láttak napvilágot, miszerint a génhiányos egerekben a farkimmerziós tesztben 45–48–50–52–57 °C-on a latenciaidő megnyúlt, míg a forró lapon 50 °C-on nem, de 52–55–58 °C-on volt latenciamegnyúlás a vad típushoz képest (Vriens *et al.*, 2011). Mindez arra utal, hogy a TRPV1-hez hasonlóan a TRPM3 is szerepet játszik az egér farkán a nociceptív küszöb beállításában, de a talpon ilyen funkciója nem valószínű; viszont a küszöbfeletti hőingerek detektálásában mindkét testtájékon szerepe van.

Az elvárásnak megfelelően a hideg ingerekkel aktiválható TRPA1 (Story *et al.*, 2003; Jordt *et al.*, 2004; Bandell *et al.*, 2004) génjét nélkülöző egerekben sem a farkon, sem a talpon mért hőküszöb nem mutatott eltérést a vad típusú kontrollokhoz képest (**75. ábra, D panel**). Az előbbi eredmény az első közölt adat a fark vonatkozásában a TRPA1 nociceptív hőküszöbben betöltött szerepének hiányáról, míg az utóbbi a küszöbmérés szintjén azt a többségi, de nem kizárólagos nézetet erősíti, hogy a TRPA1 a talp termonociceptív válaszreakcióiban nem bír szereppel (Bautista *et al.*, 2006; Kwan *et al.*, 2006 *versus* Hoffmann *et al.*, 2013).

Az egér farkán fájdalmas hideg ingerrel kiváltott nocifenzív reakció latenciaideje TRPV1-, illetve TRPA1-génhiányos egerekben

A vad típusú, illetve TRPV1- vagy TRPA1-génhiányos egerek farkokra lokalizált, nociceptív hideg ingerre adott farokkirántási reakciójának a latenciaidejét a **76. ábra** mutatja. Ez a paraméter nem volt eltérő a vad típusú kontrollhoz képest a TRPV1-génhiányos állatokban, de jelentősen megnyúlt a TRPA1-hiányos egerekben. Ez utóbbi eredmény az első adat a TRPA1 hidegnocicepcióban betöltött szerepéről a fark vonatkozásában, és azt támasztja alá, hogy a TRPA1-csatorna e testtájékon lényeges szerepet játszik a fájdalmas hideg ingerek detektálásában. Ez a következtetés összhangban áll számos korábbi adattal, amelyek a TRPA1 szerepét azonosították a fájdalmas hidegre adott válaszban (Kwan *et al.*, 2006; Karashima *et al.*,

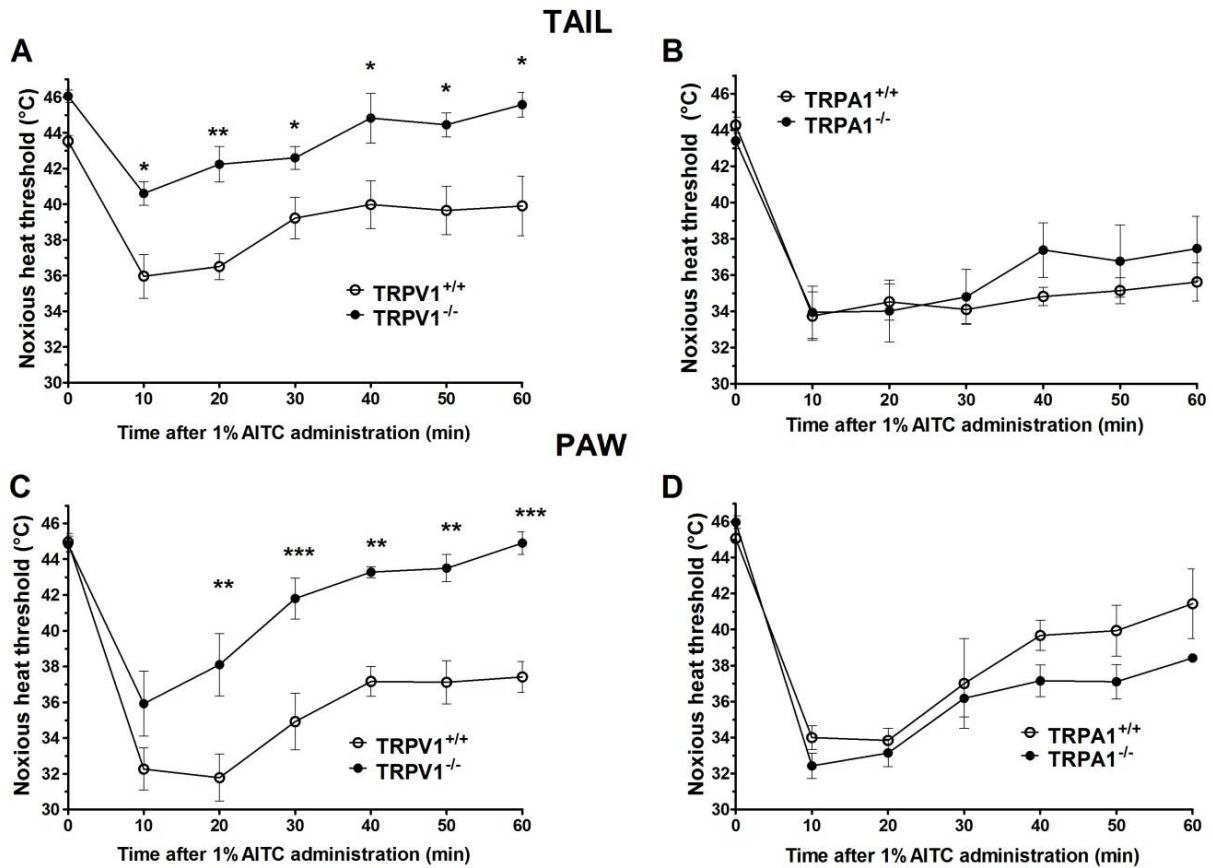
2009; Gentry *et al.*, 2010), de ellentétes másokkal, amelyek ennek ellenkezőjét mutatták ki (Bautista *et al.*, 2006; Knowlton *et al.*, 2010; del Camino *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2012). Mindezek fényében megállapítható, hogy a TRPA1 hidegnocicepcióban betöltött szerepének tisztázásához további vizsgálatok szükségesek.



76. ábra. A fájdalmas hidegingerrel (0 °C-os víz) kiváltott farokkirántási reakció latenciaideje TRPV1- (TRPV1^{-/-}) és TRPA1-génhiányos (TRPA1^{-/-}) egerekben vad típusú társaikkal (TRPV1^{+/+}, TRPA1^{+/+}) összehasonlítva. Az adatok átlag±SEM értékek (n=18–20). A csillagok statisztikailag szignifikáns eltéréseket jelölnek (**: p<0,01, egyszempontos ANOVA utáni Bonferroni-teszt).

Az AITC hatása a farok, illetve a talp nociceptív hőküszöbére TRPV1-, illetve TRPA1-génhiányos egerekben

Az AITC-okozta termális allodynia vizsgálata során a szert topikálisan alkalmaztuk, és a nociceptív hőküszöböt mind a farkon (emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel), mind a talpon (emelkedő hőmérsékletű forró lappal) ismételten mértük 10 perces időközökkel. Az AITC a nociceptív hőküszöb csökkenését váltotta ki mindkét testtájékon (**77. ábra**). A vad típusú állatokban a küszöbcsökkenés a beadás utáni 10., illetve 20. percben volt a legnagyobb mind a farkon (8–10 °C), mind a talpon (12–13 °C), és visszatérési tendenciát mutatva a vizsgált periódus (60 perc) végéig fennállt. A TRPV1-génhiányos egerekben az AITC hőküszöbcsökkentő hatása mind a farkon, mind a talpon szignifikánsan kisebb volt a vad típusú kontrollokban mérthez képest – egy kivételével – minden mérési időpontban (**77. ábra, A és C panel**). Ezzel ellentétben a TRPA1 génhiányos egerekben az AITC hatására fellépő küszöbcsökkenés nem tért el szignifikánsan a vad típusú kontrollokhoz képest sem a farkon, sem a talpon egyik időpontban sem (**77. ábra, B és D panel**).



77. ábra. A perkután alkalmazott allil-izotiocianát (AITC, 1%) hatása az egér farkának (emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel mért, **A és B panel**) és a hátsó láb talpának (emelkedő hőmérsékletű forró lappal mért, **C és D panel**) nociceptív hőküszöbére TRPV1^{-/-} (TRPV1^{-/-}) és TRPA1-génhiányos (TRPA1^{-/-}) egerekben vad típusú társaikkal (TRPV1^{+/+}, TRPA1^{+/+}) összehasonlítva. Az adatok átlag±SEM értékek (n=6). A csillagok statisztikailag szignifikáns hőküszöbcsökkenéseket (kontroll küszöb mínusz adott időpontban mért küszöb) jelentenek a vad típusban mérthez képest (*: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001, kétszemponosANOVA utáni Bonferroni-teszt).

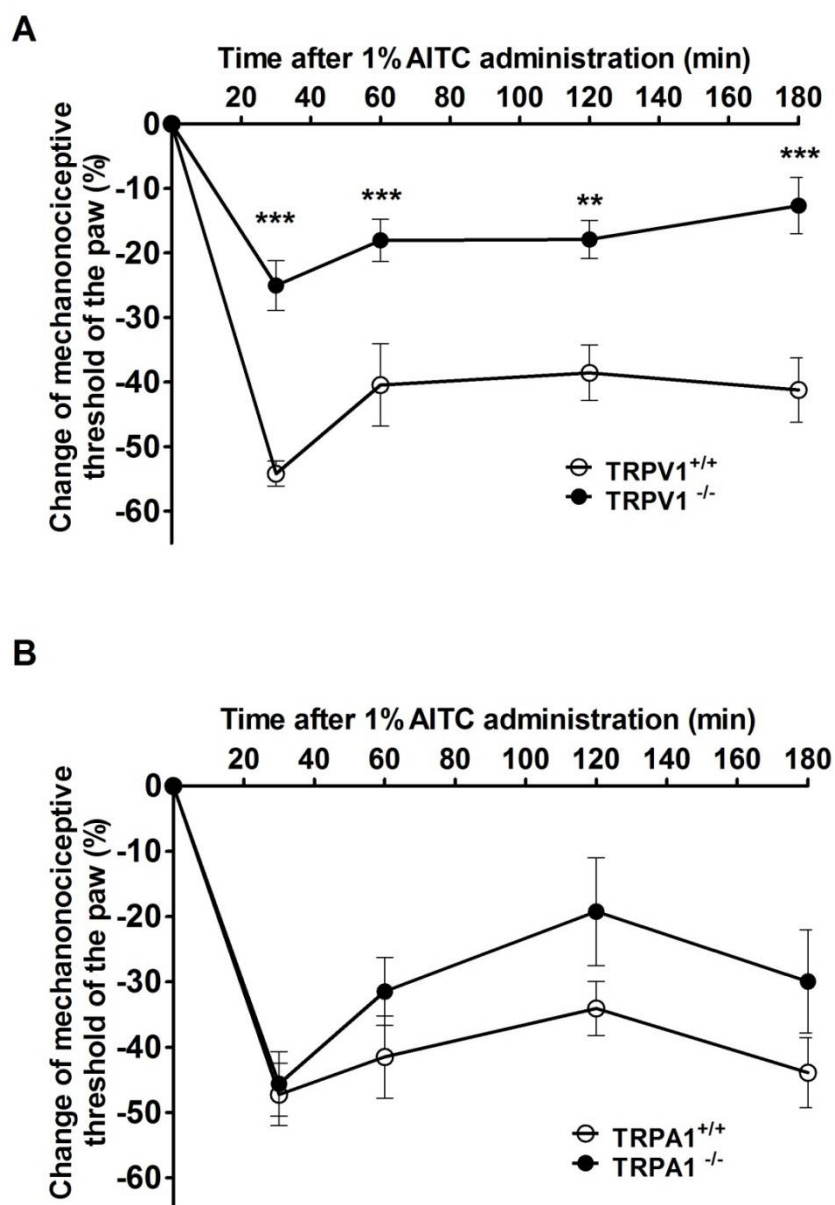
A fenti eredmények alapján levonható következtetés, miszerint az AITC-vel kiváltott hőküszöbcsökkenésben – amit termális allodyniaként lehet értelmezni – a TRPV1 lényeges szerepet játszik mind a farkon, mind a talpon, nem meglepő, hiszen számos termális hiperalgéria/allodynia-modellben (pl. karragenin, komplett Freund-adjuváns, enyhe hőtrauma, plantáris incízió) a forró ingerrel aktiválható TRPV1 jelentős, közel 100%-os mediátor szerepét igazolták a talpon (Caterina *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Walker *et al.*, 2003; Pomonis *et al.*, 2003; Gavva *et al.*, 2005; Honore *et al.*, 2005; Bölskei *et al.*, 2005; Pogatzki-Zahn *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2008; Banik és Brennan 2009). Konkrétan az AITC-vel kiváltott és a hagyományos forró lappal, illetve elektrofiziológiailag vizsgált termális hiperalgéria is döntően TRPV1-függőnek bizonyult az egér talpán (Caterina *et al.*, 2000; Eckert *et al.*, 2006). Az egér talpára vonatkozóan nyert saját adataink a nociceptív hőküszöb szintjén erősítik meg a fentieket. A TRPV1 saját kísérleteinkben feltárt hasonlóan jelentős szerepe az AITC-okozta

hőküszöbcsökkenésben az egér farkán olyan új eredmény, amely valószínűsíti, hogy e testtájék hiperalgéria/allodynia-mechanizmusai hasonlóak a talpéihoz. A TRPV1-csatorna elméletileg kétféle módon vehet részt az AITC hőküszöbcsökkentő hatásában. Egyrészt az AITC közvetlenül szenzibilizálhatja a TRPV1-et: ezt támasztja alá az, hogy TRPV1-gyel transzfektált sejtekben az AITC fokozta a hőingerrel kiváltott ionáramot (Alpizar *et al.*, 2014). Másrészt az AITC gyulladáskeltő hatású, így a hatására képződő mediátorok (bradikinin, prosztaglandinok, szerotonin stb.) is szenzibilizálhatják a TRPV1-et a PKC- és/vagy PKA-közvetítette foszforiláció révén (a részleteket illetően lásd 1.4.1.2. pont). Azonban az utóbbi mechanizmus valószínűségét csökkenti az a tény, hogy a TRPV1 szerepe már 10–20 perccel az AITC alkalmazása után kimutatható volt: ilyen rövid idő alatt számottevő gyulladási reakció még nem valószínűsíthető. A TRPA1 szerepének hiánya az AITC-vel kiváltott hőküszöbcsökkenésben meglepő, hiszen ez a csatorna egyes termális hiperalgériákban involvált (Bautista *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2011; Urata *et al.*, 2015), másrészt heterológ expressziós rendszerben az AITC 100-szor kisebb koncentrációban váltott ki ionáramot TRPA1-csatornán keresztül, mint a TRPV1-en át, jelezve, hogy az AITC TRPA1 iránti affinitása jóval nagyobb (Everaerts *et al.*, 2011).

Az AITC hatása a talp mechanonociceptív küszöbére TRPV1-, illetve TRPA1-génhiányos egerekben

Az AITC mechanonociceptív küszöbre kifejtett hatását metodikai okokból csak a talpon tudtuk vizsgálni. A dinamikus plantáris eszteziometriával meghatározott kiindulási (alap) mechanonociceptív hőküszöb nem volt különböző sem a TRPV1-, sem a TRPA1-génhiányos állatokban saját, vad típusú kontrolljukhoz képest (adatot nem mutatunk). Ez összhangban áll az idevágó irodalmi adatok többségével (Caterina *et al.*, 2000; Bölcskei *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Bautista *et al.*, 2006), kivéve egy közleményt, amely azt találta, hogy a TRPA1-KO állatok mechanonociceptív küszöbe magasabb (Kwan *et al.*, 2006). Ismert, hogy az ember bőrére alkalmazott AITC fokozza a nociceptív mechanikai érzékenységet (Koltzenburg *et al.*, 1992b). Ezzel összhangban kísérleteinkben a vad típusú állatokban az AITC mintegy 40–55%-kal lecsökkentette a talpon a mechanonociceptív küszöböt a teljes vizsgálati periódusban (**78. ábra**), azaz mechanikai allodyníát okozott. Ez a küszöbcsökkenés a TRPV1-génhiányos állatokban minden vizsgált időpontban szignifikánsan kisebb volt a vad típusú kontrollhoz képest, ellenben a TRPA1-KO egerek nem mutattak eltérést saját vad típusú kontrolljaikhoz képest (**78. ábra**). A TRPV1 jelentős szerepe az AITC által kiváltott mechanikai allodyníában nem várt eredmény. Egyrészt ugyanez a válasz a von Frey-féle módszerrel mérve változatlan maradt TRPV1-génhiányos egerekben (Caterina *et al.*, 2000). Másrészt heterológ expressziós rendszerben az

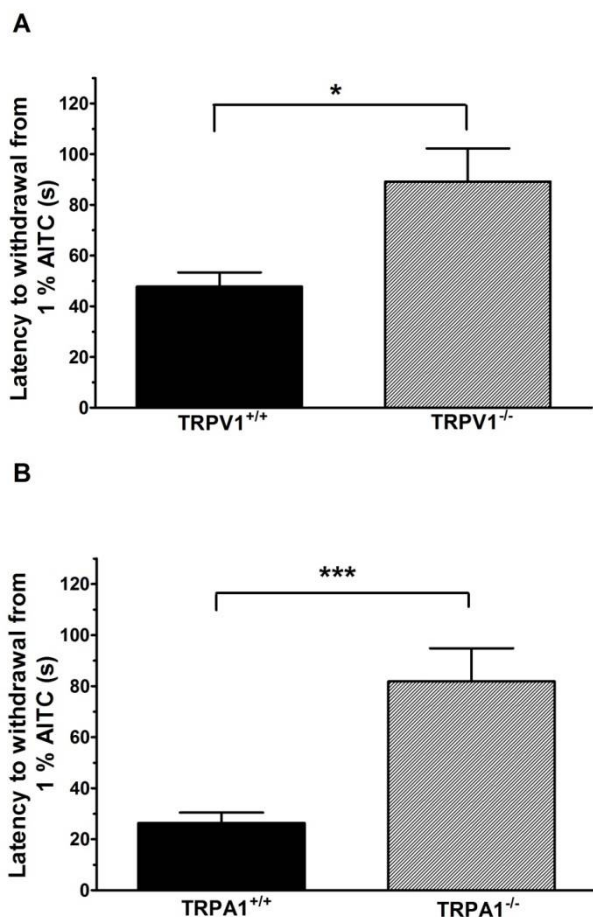
AITC a TRPA1 iránti sokkal nagyobb affinitást mutatott, mint a TRPV1 iránt (Everaerts *et al.*, 2011). Ennek fényében az is meglepő, hogy a TRPA1 egyáltalán nem játszik szerepet a küszöbközeli koncentrációban alkalmazott AITC mechanikai allodyniát okozó hatásában. A TRPV1 részvétele a válaszban hasonló mechanizmussal történhet, mint amit a TRPV1-agonista kapszaicinnel kiváltott mechanikai hiperalgémia esetében mutattak ki emberben: a jelenség a nociceptív input által kiváltott centrális szenzibilizáció következménye (LaMotte *et al.*, 1992; Torebjörk *et al.*, 1992; részletesen lásd Treede *et al.*, 1992).



78. ábra. A perkután alkalmazott allil-izotiocianát (AITC, 1%) hatása az egér hátsó láb talpának dinamikus plantáris eszteziométerrel meghatározott mechanonociceptív küszöbére TRPV1- (TRPV1^{-/-}, **A panel**) és TRPA1-génhiányos (TRPA1^{-/-}, **B panel**) egerekben vad típusú társaikkal (TRPV1^{+/+}, TRPA1^{+/+}) összehasonlítva. Az Y tengely a küszöbcsökkenést (kontroll küszöb mínusz adott időpontban mért küszöb) a kiindulási küszöb százalékában kifejezve mutatja. Az adatok átlag±SEM értékek (n=6–11). A csillagok statisztikailag szignifikáns küszöbcsökkenéseket jelentenek a vad típusban mérthez képest (**: p<0,01, ***: p<0,001, kétszemponos ANOVA utáni Bonferroni-teszt).

A fark AITC-vel kiváltott nocifenzív reakciójának latenciaideje TRPV1-, illetve TRPA1-génhiányos egerekben

Ebben a kísérletsorozatban az egér farkát 1%-os AITC-oldatba vagy annak vehikulumába (30% DMSO) mártva a farokkirántás, mint nocifenzív reakció latenciaidejét mértük vad típusú és génhiányos állatokban. A vad típusú egerekben a topikálisan alkalmazott AITC szignifikánsan lerövidítette a farokkirántás latenciaidejét a vehikulumhoz viszonyítva (TRPV1^{+/+} állatok esetén 103,0±14,3 s-ről 47,7±5,5 s-ra, TRPA1^{+/+} egerekben 62,8±5,5 s-ről 26,3±4,1 s-ra; p<0,001 mindkét esetben, egyszempontos ANOVA utáni Bonferroni-tesztel vizsgálva), ami pronociceptív hatásként értelmezhető. A latenciaidő mind a TRPV1-, mind a TRPA1-génhiányos állatokban statisztikailag szignifikáns mértékben megnyúlt a megfelelő vad típusú állatokhoz képest (79. ábra).



79. ábra. Az allil-izotiocianáttal (AITC, 1%) kiváltott farokkirántási reakció latenciaideje TRPV1- (TRPV1^{-/-}, **A panel**) és TRPA1-génhiányos (TRPA1^{-/-}, **B panel**) egerekben vad típusú társaikkal (TRPV1^{+/+}, TRPA1^{+/+}) összehasonlítva. Az adatok átlag±SEM értékek (n=8–14). A csillagok statisztikailag szignifikáns különbségeket jelentenek (*: p<0,05, ***: p<0,001, egyszempontos ANOVA utáni Bonferroni-teszt).

Mindezek alapján elmondható, hogy mind a TRPV1, mind a TRPA1 szerepet játszik az AITC-vel kiváltott nocifenzív reakció latenciaidejének a megszabásában. Saját eredményeink összecsengenek olyan korábbi adatokkal, miszerint az egér talpán az AITC-vel kiváltott nocifenzív reakció részben vagy teljesen lecsökkent TRPA1 génhiányos egerekben (Kwan *et al.*, 2006; Bautista *et al.*, 2006), ugyanakkor ellentétben vannak olyanokkal, miszerint a TRPV1

semmilyen vagy épp ellenkezőleg kizárólagos szerepet játszik a reakcióban (Caterina *et al.*, 2000; Raisinghani *et al.*, 2011; Everaerts *et al.*, 2011).

5.6.3. Fontosabb következtetések

1./ Az egér farkán a nociceptív hőküszöb meghatározásában a TRPV1-csatorna szerepe jelentős, ellenben a talpon e struktúra nem játszik szerepet a hőküszöb beállításában.

2./ A TRPA1-csatorna sem a farkon, sem a talpon nem járul hozzá a nociceptív hőküszöb meghatározásához.

3./ Az egér farkán a fájdalmas hidegingerrel kiváltott nocifenzív reakció latenciaidejének meghatározásában a TRPA1 szerepet játszik, a TRPV1 nem.

4./ Az AITC-vel kiváltott hőküszöbcsökkenésben (termális allodynában) mind a farkon, mind a talpon a TRPV1 jelentős szerepet játszik, ellenben a TRPA1 egyik testtájékon sem involvált a válaszban.

5./ Az AITC-vel kiváltott mechanonociceptív küszöbcsökkenéshez (mechanikai allodynához) a talpon a TRPV1 jelentős mértékben hozzájárul, a TRPA1 viszont nem.

6./ Az AITC-vel kiváltott nocifenzív reakció latenciaidejének meghatározásában a farkon mind a TRPV1, mind a TRPA1 szerepet játszik.

5.7. A TRPV1-receptor-agonistákkal kiváltott deszenzibilizáció vizsgálata a nociceptív hő- és hideg küszöb mérésével

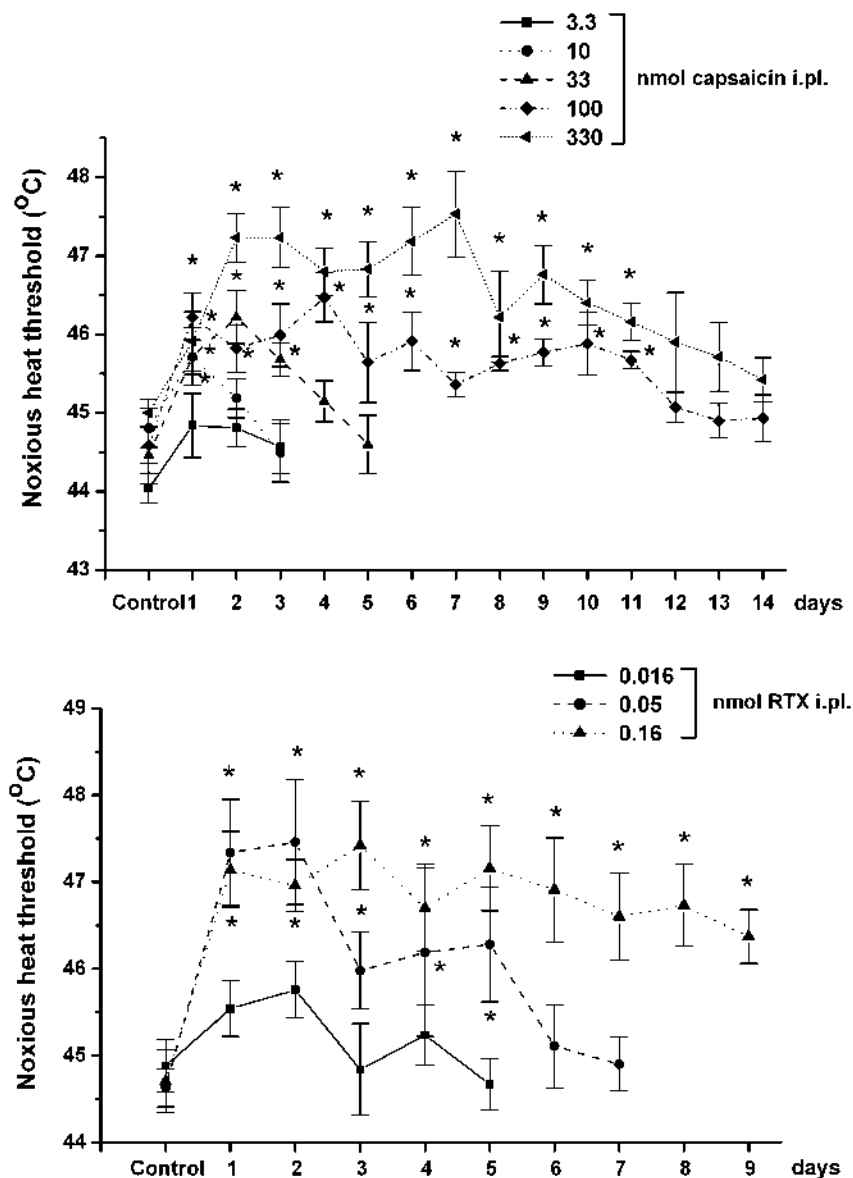
5.7.1. Előzmények és célkitűzések

A TRPV1-receptor bizonyos agonistái (pl. kapszaicin, RTX) szenzoros izgató hatásuk lezajlása után koncentráció- és időfüggő módon kétféle szenzoros deszenzibilizációt képesek kiváltani (lásd 1.4.1.5. pont): alacsonyabb koncentrációknál és rövidebb behatási időknél a TRPV1-receptorra korlátozódó deszenzibilizáció alakul ki, amelynél a nociceptív idegvégződés csak azon ingerekkel szemben mutat csökkent válaszkészséget, amelyek a TRPV1-en hatnak; magasabb koncentrációk és hosszabb behatási idők esetében az egész idegvégződésre kiterjedő deszenzibilizáció jön létre, amelynél hő, mechanikai és kémiai ingerekkel szemben egyaránt csökken a reaktivitás. Fontos, hogy bár a forró ($>43^{\circ}\text{C}$) ingerek képesek aktiválni a TRPV1-et, a bazális nociceptív hőküszöb meghatározásában patkány vagy egér talpán a TRPV1-nek nincs szerepe (lásd 4.6.3. és 5.6.2. pont). Ebből következően a TRPV1-re korlátozódó deszenzibilizációnál nem változik meg a nociceptív hőküszöb, viszont az egész idegvégződésre kiterjedő deszenzibilizáció hőküszöbemelkedéssel jár. Vizsgálataink célja az volt, hogy a klasszikus (kapszaicin, RTX) és újabban azonosított (OLDA) TRPV1-receptor-agonisták szenzoros deszenzibilizáló hatásait *in vivo* összehasonlítsuk a nociceptív hőküszöb mérésével. Tekintettel arra, hogy nem álltak rendelkezésre adatok a TRPV1-receptor-agonistáknak a fájdalmas hidegingerek detektálására kifejtett hatásaira vonatkozóan, az említett ágensek nociceptív hideg küszöbre kifejtett hosszú távú hatásait is vizsgálni kívántuk.

5.7.2. Eredmények és megbeszélés

A TRPV1-receptor-agonisták idegvégződés-szintű deszenzibilizáló hatásának vizsgálata

Korábbi vizsgálatainkban patkány hátsó lábának nociceptív hőküszöbe az emelkedő hőmérsékletű forró lappal mérve jól reprodukálható volt naponként ismételt mérések során (lásd 4.3.3. pont). Ez tette lehetővé, hogy a jelen sorozatban megvizsgáljuk a TRPV1-receptor-agonisták hosszú távú hatását és annak dózisfüggését a nociceptív hőküszöbre. Kétoldali intraplantáris adást követően mind a kapszaicin, mind az RTX megemelte a nociceptív hőküszöböt az 1–14, illetve 1–9 napos intervallumban (**80. ábra**), míg szolvenseik teljesen hatástalanok voltak. Természetesen a kapszaicin és az RTX beadás utáni 0,5–1 órán belül hőküszöbcsökkenés alakult ki (lásd 4.3.3. pont), de ez nem volt tárgya a jelen vizsgálatainknak.



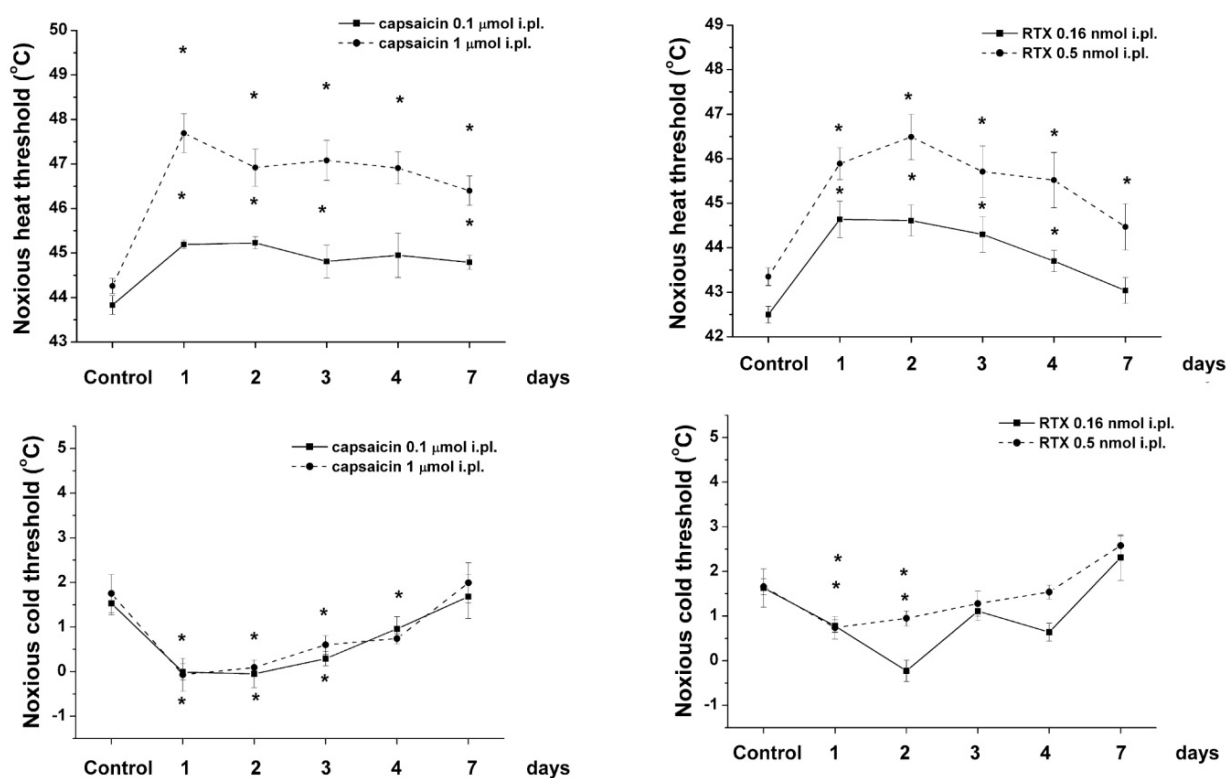
80. ábra. Kapszaicin (felső panel) vagy RTX (alsó panel) különböző dózisainak hosszú távú hatása patkányok nociceptív forró küszöbére bilaterális intraplantáris injekciót követően. Az oszlopok átlag±SEM értékek (n=8–12). A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p<0,05$) eltérő értéket jelölnek a kiindulási értékhez képest (egyszempontos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt). A legnagyobb RTX-dózis hatását nem követtük a 9. nap után, mert az 5–9. napon mért küszöbök 2 °C-kal magasabbak voltak a kontrollnál, és semmiféle visszatérési tendencia nem mutatkozott.

A két szer minimális effektív dózisa (az a legkisebb adott dózis, amelyik valamelyik mérési időpontban szignifikánsan megemelte a hőküszöböt) 10, illetve 0,05 nmól volt, jelezve, hogy az RTX mintegy 200-szor potensebb deszenzibilizáló ágens, ami egybevág korábbi adatokkal (Szállási és Blumberg, 1999). A kapszaicin és az RTX által kiváltott maximális küszöbemelkedés $2,3\pm0,5$, illetve $2,8\pm0,5$ °C volt, mutatva, hogy a két agonista hatékonysága hasonló, megerősítve azt a tényt, hogy mindkét ágens teljes agonista a TRPV1-receptoron (Ralevic *et al.*, 2003). Mindkét szer hatása tartós és dóziszfüggő volt: 10–33 nmól kapszaicin,

illetve 0,05 nmól RTX hatása reverzibilis volt, mivel a hőküszöb-emelkedés 2–5 napnál nem volt hosszabb; a magasabb dózisok hatása 11 (kapszaicin), illetve legalább 9 napig (RTX) állt fenn (a legmagasabb RTX-dózis hatása az 7–9 napon beállt egy platóra, egyértelmű visszatérési tendencia nélkül, ezért a további mérésektől eltekintettünk). Hasonló eredményt szolgáltatott korábbi, latenciaidő-mérésen alapuló vizsgálatok, amelyekben az RTX termális deszenzibilizáló hatását vizsgálták (Xu *et al.*, 1997; Neubert *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2003; Karai *et al.*, 2004). Ugyanakkor a hagyományos forró lap és „tail-flick” módszerekkel végzett vizsgálatok ellentmondásos adatokat szolgáltatottak a szisztémásan adott kapszaicin hosszú távú termális antinociceptív hatására vonatkozóan (Szolcsányi, 1976; Obál *et al.*, 1979; Hayes és Tyers, 1980; Gamse, 1982; Bittner és Lahann, 1984), noha elektrofiziológiai kísérletekben a kapszaicin egyértelműen deszenzibilizálta a forró ingerrel aktiválható polimodális nociceptorokat (Szolcsányi, 1987a; 1987b). Szolcsányi (1985) korábbi vizsgálataiban egy hozzávetőleges hőküszöbmérést lehetővé tevő módszerrel (lásd 1.3.5. pont) ki tudta mutatni a kapszaicin hosszan tartó, dózisfüggő termális antinociceptív hatását, de a jelen vizsgálat az első, amelyik egzakt hőküszöbmérést alkalmazva igazolta a kapszaicin és az RTX ezen hatását. Amint arra a fentiekben utalás történt, az emelkedő forró lappal mért nociceptív hőküszöb megemelkedése a talp nociceptív idegvégződéseinek egészére kiterjedő deszenzibilizáció jeleként értékelendő, hiszen sem a TRPV1 farmakológiai blokkolása (patkányban, 4.3.3. és 4.6.3. pont), sem genetikai deléciónja (egérben, 4.3.3. és 5.6.2. pont) nem emelte meg a hátsó végtag talpi részén mért nociceptív hőküszöböt, illetve a polimodális nociceptorok elektrofiziológiai kísérletekben meghatározott aktivációs hőküszöbét (Caterina *et al.*, 2000; Woodbury *et al.*, 2004; Zimmermann *et al.*, 2005; Banik és Brennan, 2009; Hoffmann *et al.*, 2013, lásd 1.4.1.4. pont).

Az 1,25 μ mol OLDA intraplantáris injekciója 1 héten át naponta vizsgálva nem emelte meg a nociceptív hőküszöböt (adatokat nem mutatunk). Ezt az ágenst korábban munkacsoportunk patkány TRPV1-gyel transzfektált sejteken $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -felvétel mérésével a TRPV1-receptor olyan agonistájaként azonosította, amelynek hatáserőssége 50-szer kisebb, mint a kapszaiciné, hatékonysága pedig annak 40%-a (lásd 5.3.2. pont). A jelen kísérletekben adott OLDA-dózis 125-ször nagyobb, mint a kapszaicin minimális hőküszöbemelő adagja, mutatva, hogy az OLDA minden bizonnyal kellően magas okkupanciát ért el a talp nociceptorainak TRPV1-receptorain. Ezért hatástalanságának legvalószínűbb oka parciális agonista jellege, ami miatt nem tud olyan mértékű Ca^{2+} -beáramlást okozni, mint ami az idegvégződés deszenzibilizációjához szükséges. Megjegyzendő, hogy más paradigmában (lásd lejjebb) az OLDA hatékony volt, kizárva azt a lehetőséget, hogy az oldatban elbomlott vagy az adás helyén kicsapódott stb.

A kezeletlen patkányok hátsó végtagjának talpán a csökkenő hőmérsékletű hideg lappal mért nociceptív hideg küszöb $1,3 \pm 0,2$ °C-nak adódott ($n=8$); ez az érték 5 napon át végzett, naponta ismételt mérések során jól reprodukálható volt (adatokat nem mutatunk). Ez az érték jóval alacsonyabb, mint az emberben mért 15 °C körüli küszöbhőmérséklet (Davis és Pope, 2002). A hideg lapon ugyanolyan magatartási nocifenzív reakciókat figyeltünk meg, mint a forró lap esetében (típusosan a hátsó végtag nyalása vagy megemelése). Az ugyanazon állatokban párhuzamosan mért forró és hideg küszöb összehasonlításával kiderült, hogy mind a kapszaicin, mind az RTX esetében csak a magasabb dózisok csökkentették le a hideg küszöböt – a hőküszöb megemelése mellett (**81. ábra**) –, mint amelyek az előző sorozatban a hőküszöb megemeléséhez minimálisan szükségesek voltak. Mindkét szer esetében a két vizsgált dózis hideg küszöbre kifejtett hatása hasonló mértékű volt, míg a forró küszöbre gyakorolt hatásuk lényegesen eltért. Előbbi lehetséges magyarázata egyfajta „ceiling” effektus, mivel a laphőmérséklet lehetséges minimuma -1 °C volt. A szerek hideg küszöböt csökkentő hatása 2–4 nap után visszatért a kontroll értékre; ekkor a forró küszöb még magasán a kiindulási érték fölött volt. Ez arra utal, hogy a fájdalmas hideg és forró ingereket detektáló nociceptorok különböző populációkba tartoznak.



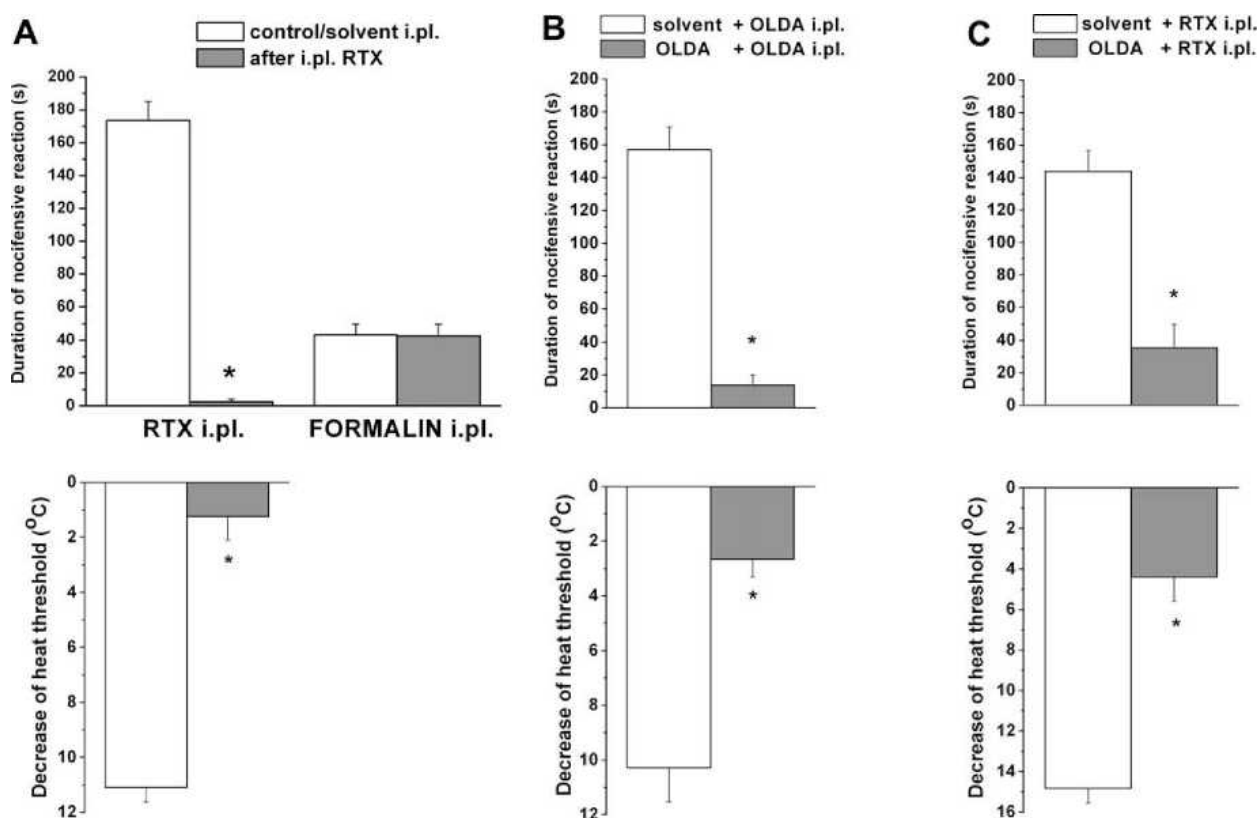
81. ábra. Kapszaicin (bal oldali panelek) vagy RTX (jobb oldali panelek) különböző dózisainak hatása az ugyanazon állatokban párhuzamosan vizsgált nociceptív forró és hideg küszöbre bilaterális intraplantáris injekciót követően. Az oszlopok átlag±SEM értékek ($n=8-12$). A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p<0,05$) eltérő értéket jelölnek a kiindulási értékhez képest (egyszempontos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt).

A fájdalmas hideg ingerek detektálásában elsősorban nem a polimodális nociceptorok vesznek részt (bár ezek egy része fájdalmas hideggel is aktiválható C-MHC, illetve A-MHC rost), hanem a „mechano-cold-sensitive” A δ és C nociceptorok (A-MC és C-MC rostok; Burgess és Perl, 1967; Bessou és Perl, 1969; Cain *et al.*, 2001; Leem *et al.*, 1993; Campero *et al.*, 1996; Simone és Kajander, 1996). A jelenleg ismert, hideggel aktiválható TRP-ioncsatornák a TRPM8 (McKemy *et al.*, 2002; Peier *et al.*, 2002a) és a TRPA1 (Story *et al.*, 2003), amelyek aktivációs küszöbe 25, illetve 17 °C, legalábbis *in vitro*. Mindezek alapján azt lehet feltételezni, hogy a hidegérzékeny nociceptorok magas frekvenciájú kisülése szükséges a fájdalmas hideg ingerekkel kiváltott nocifenzív reakcióhoz. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján feltételezhető az is, hogy a nociceptív hideg küszöb kapszaicinnel, illetve RTX-szel kiváltott tartós csökkenése azáltal jön létre, hogy olyan hidegérzékeny nociceptív idegvégződések károsodása jön létre, amelyek a hideggel aktiválható ioncsatornák mellett a TRPV1-et is expresszálják. Ezt a lehetőséget alátámasztja a TRPA1 és TRPV1 jelentős koexpressziója DRG neuronokban (Story *et al.*, 2003). A hidegérzékeny nociceptív idegvégződések TRPV1-agonistával kiváltott károsodásának hátterében álló mechanizmusok teljesen ismeretlenek, de elméletileg hasonló folyamatok tételezhetők fel, mint a forró ingerekkel aktiválható polimodális nociceptorok esetében. Az idegvégződés-szintű deszenzibilizáció klinikai jelentőségét látványosan igazolja az a 8% kapszaicint tartalmazó dermális tapasz (Qutenza), amely 30 vagy 60 perces kontaktusidő után az epidermális és dermális polimodális nociceptív terminálisokat deszenzibilizálva fejt ki 3 hónapig tartó analgetikus hatást neuropátiás fájdalom különböző formáiban.

A TRPV1-receptor-agonisták TRPV1-re korlátozódó deszenzibilizáló hatásának vizsgálata

Ebben a sorozatban az RTX és az OLDA TRPV1-receptor által közvetített akut hatásait (nocifenzív reakció, hőküszöbcsökkenés) elemeztük (lásd 4.3.3. és 5.3.2. pont). Az intraplantárisan adott RTX (0,016 nmól) nocifenzív reakciót váltott ki, amely 5 percen belül megszűnt (**82. ábra, A panel, felül**). Ekkor jelentős hőküszöbcsökkenés (termális allodynia) volt mérhető (**82. ábra, A panel, alul**), amely 30 percen belül lezajlott. Az RTX-kezelés után 3 órával a nociceptív hőküszöb a kontroll tartományban volt. Az ekkor megismételt RTX-injekció (0,016 nmól) az előzőleg kezelt talpba adva szignifikánsan rövidebb nocifenzív reakciót, illetve kisebb mértékű hőküszöbcsökkenést okozott, mint az RTX szolvensével végzett 3 órás előkezelést követően (**82. ábra, A panel**). Ezzel szemben ugyanilyen RTX-előkezelés (0,016 nmól, 3 óra) nem csökkentette a TRPA1-agonista formalin (McNamara *et al.*, 2007) 1%-os intraplantáris injekciójával kiváltott nocifenzív reakció időtartamát (**82. ábra, A panel, felül**).

Ezek az eredmények azt jelzik, hogy van olyan RTX-dózis, amelyik 3 óras előkezelés után nem befolyásolja a bazális hőküszöböt, de lecsökkenti a megismételt RTX-dózissal kiváltott, TRPV1-közvetítette nocifenzív válaszokat (nocifenzió, hőküszöbcsökkenés) anélkül, hogy a TRPV1-gyel koexpresszáldó TRPA1 aktiválása révén ható formalin nocifenzív hatását módosítaná. Ez azt jelenti, hogy ez az RTX-dózis szelektíven csak a TRPV1 válaszkészségét csökkentette le, anélkül, hogy a polimodális nociceptív idegvégződés más aktivátorainak (forró inger, formalin) hatását mérsékelné, tehát TRPV1-receptor-deszenzibilizációt váltott ki. Hasonló eredményeket nyertünk az OLDA-val. 250 nmól OLDA-val végzett 3 óras előkezelés után a hőküszöb a kontroll tartományban volt, és az ekkor az ugyanazon lábba adott 5 nmól OLDA mindkét hatása (nocifenzív reakció és hőküszöbcsökkenés) jelentősen lecsökkent a szolvenssel végzett 3 óras előkezeléshez képest (**82. ábra, B panel**). A nagy dózisú OLDA-val végzett 3 óras előkezelés az RTX pronociceptív hatásait is gátolta (**82. ábra, C panel**), jelezve az OLDA és az RTX közötti kereszt-deszenzibilizáció kialakulását.



82. ábra. Intraplantáris RTX-szel (0,016 nmól, **A panel**), illetve OLDA-val (250 nmól, **B és C panel**) végzett 3 óras előkezelés hatása az ugyanazon talpba adott RTX-szel (0,016 nmól) vagy OLDA-val (5 nmól) kiváltott nocifenzív reakció időtartamára, illetve a nociceptív hőküszöb csökkenésére. Az A panel az RTX-előkezelésnek a formalinnal (1%) kiváltott nocifenzív reakció időtartamára kifejtett hatását is mutatja. Az oszlopok átlag±SEM értékek (n=8). A csillagok statisztikailag szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseket jelölnek a két RTX-hatás között (A panel, Student-féle egymintás t-próba), illetve az adott szer szolvenséhez viszonyítva (B és C panel, Student-féle kétmintás t-próba).

Figyelembe véve, hogy a TRPV1 deszenzibilizációja hasonló hatást eredményez, mint annak antagonizálása, az RTX és OLDA TRPV1-receptorra korlátozódó deszenzibilizáló hatásának is van potenciális klinikai jelentősége (lásd 1.4.1.3. pont).

5.7.3. Fontosabb következtetések

1./ A nociceptív forró és hideg küszöb párhuzamos mérésével kimutattuk, hogy a patkány talpába adott kapszaicin és RTX – de nem az OLDA – képes napokig tartó termális antinociceptív hatást kiváltani mindkét hőmérsékleti irányba. A nociceptív hideg küszöb csökkenése rövidebb ideig tart, mint a forró küszöb emelkedése.

2./ A fenti két hatás a TRPV1-et expresszáló és a forró, illetve fájdalmas hideget detektáló nociceptív perifériás idegvégződések funkcionális károsodásának a manifesztációja.

3./ Az RTX és az OLDA alacsonyabb dózisai képesek a TRPV1-receptorra korlátozódó deszenzibilizációt kiváltani.

4. / Mindkét fajtájú deszenzibilizáció (idegvégződés- *versus* TRPV1-szintű) relevanciával bír új, perifériás támadáspontú analgetikumok fejlesztése szempontjából.

5.8. A nociceptív hőküszöb és a latenciaidő összehasonlító vizsgálata a carrageninnel kiváltott termális szenzibilizációban (nem közölt eredmények)

5.8.1. Előzmények és célkitűzés

Kísérleteink során számos akut (RTX, α - β -metilén-ATP, OLDA, 3-MOLDA, AITC, hőtrauma) és egy szubakut/krónikus modellben (plantáris bemetszés) tudtuk kimutatni a nociceptív hőküszöb csökkenését, azaz a termális allodyniát. Ismert, hogy a TRPV1-receptor és a P2X3-receptor aktivációja, az AITC, a hőtruma, az incízió esetében a latenciaidő-mérésen alapuló módszerekkel a latenciaidő rövidülése, azaz termális hiperalgéria is kimutatható (Gilchrist *et al.*, 1996; Yeomans *et al.*, 1996; Hamilton *et al.*, 1999; Coderre és Melzack, 1987; Cleland *et al.*, 1994; Nozaki-Taguchi és Yaksh, 1998; Field *et al.*, 1997; Zahn és Brennan, 1999). Mindez azt sugallja, hogy a nociceptív hőküszöb csökkenése és a küszöbfeletti hőingerre adott válasz nagyságának növekedése (lásd **1. ábra**) egymáshoz kapcsolt jelenségek, azaz a hőküszöb és a küszöbfeletti hőingerre adott válasz párhuzamosan változik. Ennek a hipotézisnek

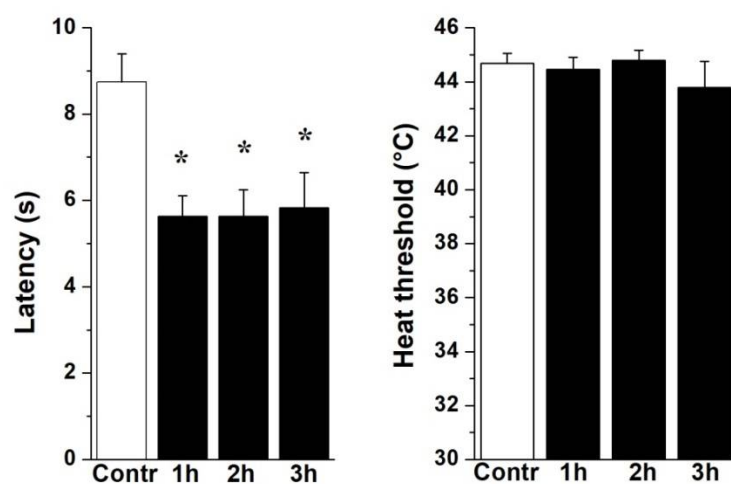
a teszteléséhez egy szubakut modellben, a carrageninnel kiváltott termális szenzibilizációban párhuzamosan vizsgáltuk a nociceptív hőküszöböt és a küszöbfeletti hőingerre adott válasz latenciáidejét. Ismert, hogy a carragenin a plantártesztzel vizsgálva latenciarövidülést okoz (Hargraves *et al.*, 1988), és ez a paradigma gyakran vizsgált termális hiperalgéria-modell.

5.8.2. Módszerek

Kísérleteinkben az IITC Life Sciences Inc. (Woodland Hills, CA, USA) által gyártott „incremental hot/cold plate analgesia meter”-t használtuk, amely emelkedő hőmérsékletű üzemmódban a forró küszöb, állandó hőmérsékletű üzemmódban a latenciaidő mérésére alkalmas. Segítségével ugyanazon állatcsoportban párhuzamosan tudtuk mérni a hőküszöböt és a latenciaidőt. Először meghatároztuk a patkányok egyik hátsó végtagján mind a kiindulási nociceptív hőküszöböt (30 °C kiindulási hőmérséklet és 6 °C/perc fűtési sebesség mellett), mind ugyanazon hátsó láb nyalásáig eltelt időt (50 °C-os laphőmérséklet mellett). Ezután carragenint (3%, fiziológias sóoldatban diszpergálva, 100 µl térfogatban) adtuk intraplantárisan a vizsgált lábba. Mind a nociceptív hőküszöböt, mind a latenciaidőt óránként mértük.

5.8.3. Eredmények és megbeszélés

A carragenin 1 óra elteltével gyulladásos reakciót váltott ki a kezelt lábon bőrpír, ödéma formájában, amely 3–4 órán át fennmaradt. Meglepő módon a nociceptív hőküszöb nem változott érdemben a kezelés utáni 1–3 órás intervallumban, ellenben a latenciaidő szignifikáns módon lerövidült mindhárom mérési időpontban (**83. ábra**).



83. ábra. A talpba adott carragenin hatása az 50 °C-os forró lapon mért latenciaidőre (**bal oldali panel**) és az emelkedő hőmérsékletű forró lapon mért nociceptív hőküszöbre (**jobb oldali panel**) ugyanazon 16 patkányban. Az oszlopok átlag±SEM értékek. A csillagok statisztikailag szignifikánsan ($p < 0,05$) eltérő értéket jelölnek a kontrollhoz (Contr) képest (egyszempontos ANOVA utáni Newman–Keuls-teszt).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a termális szenzibilizáció két paramétere, az aktivációs küszöb és a küszöbfeletti hőingerre adott válasz latenciaideje nem feltétlenül kapcsolatos, ami eltérő patofiziológiai szabályozásukra utal: a küszöböt a hővel aktiválható ioncsatornák determinálják, míg a hőválasz nagyságát (ami a latenciaidőben kódolódik) a feszültségfüggő Na^+ -csatornák aktivitása (a részleteket illetően lásd 3.4.3. pont). Eredményeink azt mutatják, hogy a kiváltó ágens szabja meg, hogy a termális szenzibilizáció okoz-e hőküszöbcsökkenést vagy sem. Mivel a hőtraumával kiváltott, hőküszöbcsökkenéssel járó termális szenzibilizáció kinetikájában összemérhető a carrageninnel keltett, hőküszöbcsökkenést nem okozó hőhiperalgéziával, a szenzibilizáció időtartama nem tűnik meghatározó tényezőnek. Említésre méltó, hogy saját *in vitro* elektrofiziológiai kísérleteinkben a $\text{PGE}_2/\text{PGI}_2$ fokozta a küszöbfeletti hőingerrel kiváltott akciós potenciálok számát, de nem csökkentette le a hőküszöböt (3.4.2. pont), illetve ugyanebben a preparátumban hasonlóképpen viselkedtek a membránpermeábilis, stabil cAMP-analógok (Kress *et al.*, 1996).

5.8.4. Következtetés

A termális szenzibilizáció két paramétere, az aktivációs küszöb és a küszöbfeletti hőingerre adott válasz latenciaideje nem feltétlenül kapcsolatos: a kiváltó ágens – egyelőre nem azonosított tulajdonsága – szabja meg, hogy a termális szenzibilizáció a latenciaidő rövidülése mellett kivált-e hőküszöbcsökkenést vagy sem.

6. A FONTOSABB EREDMÉNYEK ÉS FELISMERÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA

A termonocicepciót vizsgáló *in vitro* kísérletekben izolált patkánybőr C polimodális nociceptorairól történő egyrost-elvezetéssel kimutattam, hogy a tartós bradikininexpozíció szenzibilizáló hatása a rostok hőválaszára COX-függő folyamat, amelynek közvetítésében a $\text{PGE}_2/\text{PGI}_2$ szerepet játszik. Megfogalmaztunk egy hipotézist, mely szerint a bradikinin direkt akcióspotenciál-generáló hatással nem bír, az annak tartott hatás extrém fokú hőküszöbcsökkenés következménye, amely miatt a normál környezeti hőmérséklet folyamatos hőingerként hat. Feltételezhető, hogy más kémiai ágensek – mint ATP, szerotonin, prosztaglandinok –, amelyek hasonló mértékű hőküszöbcsökkenést tudnak kiváltani – legalábbis részben – így fejtik ki nociceptor-aktiváló hatásukat. A magas koncentrációban alkalmazott $\text{PGE}_2/\text{PGI}_2$ fokozta a polimodális nociceptorokban a hőingerléssel kiváltott akciós potenciálok számát anélkül, hogy azok hőküszöbét megváltoztatta volna, jelezve, hogy az aktivációs hőküszöb és a küszöbfeletti ingerre adott válasz szenzibilizálhatósága eltérő. Izolált patkánybőrben a $\text{PGE}_2/\text{PGI}_2$ magas koncentrációban sem befolyásolta a forró ingerléssel kiváltott CGRP-felszabadulást, ellenben az alacsony pH-val (protonokkal) kiváltott válaszra facilitáló hatást fejtett ki. Ez arra utal, hogy a peptiderg polimodális nociceptorok afferens (akciós potenciált generáló) és lokális efferens (neuropeptid-felszabadító) funkciójának szenzibilizálhatósága eltérő, ami a két folyamat eltérő ionális hátterével függhet össze. A forró ingerekkel kiváltott CGRP-felszabadulást nem gátolta a TRPV1-antagonista ruténiumvörös, illetve capsazepin, megerősítve, hogy a patkány lábán a TRPV1 szerepe a forró ingerek transzdukciójában a nociceptív primer afferens neuronok perifériás végződéseiben – szemben a sejttesttel – marginális.

A magatartási nociceptív hőküszöb az általunk kifejlesztett mindkét készülékkel (emelkedő hőmérsékletű forró lap és emelkedő hőmérsékletű vízfürdő) mérve kiválóan reprodukálható ismételt mérések során, alkalmassá téve a módszert kis küszöbváltozások kimutatására. Az emelkedő hőmérsékletű forró lap alkalmas nemcsak ópioid analgetikum (morfin), hanem COX-gátló fájdalomcsillapítók (diclofenac és paracetamol) hőküszöbemelő (termális antinociceptív) hatásának nagy érzékenységgel történő kimutatására. Az új műszerekre három, hőküszöbcsökkenésen alapuló termális allodynia-modellt dolgoztunk ki és validáltunk. A talpba adott RTX fél órán belül lezajló akut hőküszöbcsökkenést vált ki, míg az enyhe hőtrauma kb. 1 órán át fennálló szintén akut, a talpi bemetszés pedig legalább 1 hétig elhúzódó szubakut/krónikus küszöbcsökkenést okoz; a két utóbbi modell közvetlen klinikai relevanciával

bír. A három paradigma közös előnye, hogy a morfin, diclofenac és paracetamol hőküszöbcsökkenést gátló (antiallodyniás) dózisa alacsonyabbak, mint a nem érzékenyített hőküszöb emeléséhez szükséges adagok, jelezve a modellek farmakológiai érzékenységét nemcsak szisztémás, hanem lokális adásmód esetén is. Mindhárom modell, különösen az RTX-szel kiváltott allodynia alkalmas a perifériás nociceptorokon ható TRPV1-receptor-antagonisták hatásának vizsgálatára, nagyságrenddel nagyobb érzékenységet mutatva, mint a latenciaidő-mérési forró lap módszer. A hőküszöbmérési paradigmát sikerült adaptálni egérre a farok hőküszöbének emelkedő hőmérsékletű vízfürdővel történő mérésével. Ezen módszer állattartó hengerekkel kiegészített formájában különösen alkalmas a nociceptív hőküszöb meghatározására, kiküszöbölve az állat kézbentartásából eredő stresszt és annak variabilitását. Egerek vizsgálata során analgetikumok közötti, illetve analgetikum és pszichoaktív szer közötti antinociceptív interakciók kimutatására is sor került.

A hőküszöbmérés segítségével sikerült analizálni az enyhe hőtraumával és a plantáris bemetszéssel kiváltott termális allodynia perifériás mediátorhátterét arra a következtetésre jutva, hogy csak viszonylag kis különbségek állnak fenn: a B₂-bradikininreceptor, P2X-purinoceptor(ok) és a TRPV1-receptor, valamint prosztanoidok és az NO szerepét mindkét modellben igazoltuk; a hőtrauma esetében lipoxigenáz-termékek, az incíziónál a B₁-bradikininreceptor járulékos szerepére derült fény. A potenciális TRPV1-ligandum zsírsavamidok vizsgálata során az intracelluláris Ca²⁺-szint, valamint intraplantáris adás után a nocifenzív reakció és a nociceptív hőküszöb mérésével kimutattuk, hogy az OLDA és a 3-MOLDA TRPV1-receptor-agonista hatásúak. Ezzel szemben a 4-MOLDA és az OEA TRPV1-antagonistaként viselkedett a fenti paradigmákban, míg az anandamid kizárólag CB₁-receptor-agonista tulajdonságokat mutatott. Ismereteim szerint elsőként hasonlítottuk össze a PKA és PKC szerepét a TRPV1-receptor válaszkészségének meghatározásában, ugyanabban az *in vitro* (patkány trigeminális neuronok kapszaicinnel, illetve RTX-szel kiváltott Ca²⁺-akkumulációja) és *in vivo* (RTX-okozta nociceptív hőküszöbcsökkenés patkányban) modellben. Az *in vitro* és az *in vivo* modellben nyert konkordáns adatok alapján alaphelyzetben a TRPV1-receptor agonisták iránti érzékenységének beállításában a PKA jelentős szereppel bír, a PKC viszont nem. Ugyanakkor mind a PKA, mind a PKC stimulációja képes fokozni a TRPV1 válaszkészségét mind a trigeminális érző neuronok sejttestében, mind a talpbőr perifériás nociceptoraiban.

Direkt bizonyítékot szolgáltatunk arra, hogy a perifériás nociceptorok izgatása távoli antiallodyniás hatást (termális és mechanikai) fejt ki, amelynek indukciója központi idegrendszeri ellenregulációs, antinociceptív folyamatoktól (mint pl. descendáló gátlás, DNIC) független. Ezen hatás közvetítésében igazoltuk nemcsak a szomatosztatin, hanem az endogén

ópioidok szerepét is. E mediátorok forrása(i) és támadáspontja(i) nem azonosítható(k) pontosan, de a szomatosztatin az ingerelt nociceptorokból szabadul fel és valószínűleg a perifériás nociceptív idegvégződéseken fejti ki antiallodyniás hatását. Eredményeink szerint a nociceptorok izgatásával kiváltott „szenzokrin” hatás – mint a peptiderg nociceptorok harmadik funkciója – nemcsak a korábban leírt gyulladásgátló mechanizmust foglalja magába, hanem direkt antiallodyniás komponenst is involvál. Felvetődik a szerepe az ellenirritációval kiváltott analgetikus/antinociceptív hatásokban. Konceptcionális szempontból jelentős felfedezésnek tartom, hogy a perifériás nociceptorok nemcsak a fájdalmas ingerek felfogásában játszanak szerepet, hanem perifériásan indukálódó antiallodyniás hatás mediátorának forrását és támadáspontját is jelentik egyben.

Génhiányos egerek hőküszöbmérési vizsgálatával elsőként sikerült kimutatni, hogy az egér farkán a nociceptív hőküszöb meghatározásában a TRPV1 szerepet játszik, ellenben a talpon e struktúra funkciója nem mutatható ki. Ezen eredmény transzlációs szempontból jelentős, mivel a TRPV1 emberben is szerepet játszik a termális fájdalomküszöb meghatározásában. A TRPA1-csatorna sem a farkon, sem a talpon nem járul hozzá a nociceptív hőküszöb meghatározásához. Az AITC-vel kiváltott hőküszöbcsökkenés (hőallodynia) mind a farkon, mind a talpon TRPV1-függő, ellenben a TRPA1 egyik testtájékon sem involvál. Hasonló a helyzet az AITC-vel a talpon kiváltott mechanikai allodynia esetében is.

Az emelkedő hőmérsékletű forró lap alkalmas a talpba adott kapszaicin és az RTX lassan kialakuló, napokig/hetekig tartó, idegvégződés-szintű deszenzibilizáló hatásának a kimutatására, amely kísérleteinkben a nociceptív hőküszöb hosszú távú emelkedésében nyilvánult meg. Az OLDA ilyen hatást nem tud kiváltani, vélhetően parciális agonista jellege miatt. Az RTX és az OLDA alacsonyabb dózisa a TRPV1-receptorra korlátozódó deszenzibilizációt váltanak ki. Mindkét fajta deszenzibilizáció (idegvégződés- *versus* TRPV1-szintű) relevanciával bír új, perifériás támadáspontú analgetikumok fejlesztése szempontjából.

A carrageninnel kiváltott termális szenzibilizáció vizsgálata során kimutattuk, hogy a nociceptív hőküszöb csökkenése és a küszöbfeletti hőingerre adott nocifenzív válaszreakció latenciáidejének megrövidülése nem feltétlenül együttjáró jelenségek, ami a hőválasz két paraméterének eltérő patofiziológiai szabályozására utal.

Összefoglalóan elmondható, hogy a nociceptív hőküszöb mérését egyfelől eredményesen alkalmaztuk különböző termális allodynia-modellekben a standard ópioid és COX-gátló analgetikumok hatásának nagy érzékenységgel történő kimutatására. Kiemelendő a hőküszöbmérési paradigma létjogosultsága az új típusú, a perifériás nociceptorokon ható analgetikumok tesztelésében, hiszen érzékenysége jelentősen felülmúlja a latenciaidő-mérésen

alapuló módszerét. Másfelől a hőküszöbmérés alkalmazásával neuroregulációs szempontból kiemelkedő fontosságú mechanizmusokra is sikerült fényt deríteni (nociceptor aktiváció masszív hőküszöbcsökkenés révén, a peptiderg nociceptorok távoli antiallodynias hatása). A kísérletek során sikerült olyan célpontok (mediátorok, receptorok, enzimek) azonosítása a perifériás nociceptorokban, amelyek farmakológiai befolyásolása új típusú, perifériás támadáspontú és ezáltal kevesebb mellékhatással bíró analgetikumok kifejlesztéséhez vezethet. Reményeim szerint a nociceptív hőküszöb mérése hosszú távon is alkalmazott referenciamódszerré fog válni mind a gyógyszergyári tesztelésben, mind az alap kutatásban. Ennek eléréséhez azonban még komoly barriert kell áttörni további meggyőző kísérletekkel, hiszen kereskedelmi forgalomban nem elérhető, ráadásul nem konvencionális elven működő műszer gyógyszergyári rutinhasználatba való bevezetése nem egyszerű feladat.

7. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AITC:	allil-izotiocianát
A-MH:	mechano–heat-sensitive A nociceptor
ANOVA:	analysis of variance
CGRP:	calcitonin gene-related peptide
C-MH:	mechano–heat-sensitive C nociceptor
COX:	ciklooxygenáz
C-SOM:	cikloszomatosztatin
dbcAMP:	dibutiril-cAMP
DMSO:	dimetil-szulfoxid
DNIC:	diffuse noxious inhibitory controls
DRG:	dorsal root ganglion
ECS:	extracellular solution
I-RTX:	jódresiniferatoxin
KO:	knock-out
L-NOARG:	N(G)-nitro-l-arginin
MOLDA:	metil- <i>N</i> -oleoildopamin
meATP:	α - β -metilén-ATP
NDGA:	nordihydroguaiaretic acid
NGF:	nerve growth factor
NK:	neurokinin
NSAID:	nem-szteroid gyulladásgátló analgetikum
OEA:	<i>N</i> -oleoiletanolamid
OLDA:	<i>N</i> -oleoildopamin
PKA:	protein-kináz A
PKC:	protein-kináz C
PMA:	forbol-12-mirisztát-13-acetát
PPADS:	piridoxál-foszfát-6-azofenil-2',4'-diszulfonát
ROI:	region of interest
RTX:	resiniferatoxin
SIF:	synthetic interstitial fluid
SOM:	szomatosztatin
SP:	P-anyag
TNP-ATP:	trinitrofenil-ATP
TRP:	tranziens receptor potenciál

8. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA (az értekezésben való megjelenés sorrendjében)

3. fejezet

1. **Pethő, G.**, Derow, A., Reeh, P.W.: Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin.
European Journal of Neuroscience, 14:210-218, 2001.
2. Reeh, P.W., **Pethő, G.**: Nociceptor excitation by thermal sensitization – a hypothesis.
Progress in Brain Research, 129:39-50, 2000.
3. Derow, A., Izydorczyk, I., Kuhn, A., Reeh, P.W., **Pethő, G.**: Prostaglandin E₂ and I₂ facilitate noxious heat-induced spike discharge but not iCGRP release from rat cutaneous nociceptors.
Life Sciences, 81:1685-1690, 2007.
4. **Pethő, G.**, Izydorczyk, I., Reeh, P.W.: Effects of TRPV1 receptor antagonists on stimulated iCGRP release from isolated skin of rats and TRPV1 mutant mice.
Pain, 109:284-290, 2004.

4. fejezet

1. Almási, R., **Pethő, G.**, Bölcskei, K., Szolcsányi, J.: Effect of resiniferatoxin on the noxious heat threshold temperature in the rat: a heat allodynia model sensitive to analgesics.
British Journal of Pharmacology, 139:49-58, 2003.
2. Bölcskei, K., Horváth, D., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Heat injury-induced drop of the noxious heat threshold measured with an increasing-temperature water bath: a novel rat thermal hyperalgesia model.
European Journal of Pharmacology, 564:80-87, 2007.
3. Füredi, R., Bölcskei, K., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Effects of analgesics on the plantar incision-induced drop of the noxious heat threshold measured with an increasing-temperature water bath in the rat.
European Journal of Pharmacology, 605: 63-67, 2009.
4. Tékus, V., Bölcskei, K., Kis-Varga, A., Dézsi, L., Szentirmay, E., Visegrády, A., Horváth, C., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Effect of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor antagonist compounds SB705498, BCTC and AMG9810 in rat models of thermal hyperalgesia measured with an increasing-temperature water bath.
European Journal of Pharmacology, 641:135-141, 2010.
5. Boros, M., Benkó, R., Bölcskei, K., Szolcsányi, J., Barthó, L., **Pethő, G.**: Effects of reference analgesics and psychoactive drugs on the noxious heat threshold of mice measured by an increasing-temperature water bath.
Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology, 113:385–390, 2013.

5. fejezet

1. Füredi, R., Bölcskei, K., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Comparison of the peripheral mediator background of heat injury- and plantar incision-induced drop of the noxious heat threshold in the rat.
Life Sciences, 86:244-250, 2010.
2. Szolcsányi, J., Sándor, Z., **Pethő, G.**, Varga, A., Bölcskei, K., Almási, R., Riedl, Zs., Hajós, G., Czéh, G.: Direct evidence for activation and desensitization of the capsaicin receptor by N-oleoyldopamine on TRPV1-transfected cell line, in gene deleted mice and in the rat.
Neuroscience Letters, 361:155-158, 2004.
3. Almási, R., Szőke, É., Bölcskei, K., Varga, A., Riedl, Zs. Sándor, Z., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Actions of 3-methyl-N-oleoyldopamine, 4-methyl-N-oleoyldopamine and N-oleoylethanolamide on the rat TRPV1 receptor in vitro and in vivo.
Life Sciences, 82:644-651, 2008.
4. Varga, A., Bölcskei, K., Szőke, É., Almási, R., Czéh, G., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of TRPV1 receptor responsiveness in rat sensory neurons in vitro and peripheral nociceptors in vivo.
Neuroscience, 140:645-657, 2006.
5. **Pethő, G.**, Bölcskei, K., Füredi, R., Botz, B., Bagoly, T., Pintér, E., Szolcsányi, J.: Evidence for a novel, neurohumoral antinociceptive mechanism mediated by peripheral capsaicin-sensitive nociceptors in conscious rats.
Neuropeptides, 62:1-10, 2017.
6. Tékus, V., Horváth, Á., Hajna, Z., Borbély, É., Bölcskei, K., Boros, M., Pintér, E., Helyes, Z., **Pethő, G.**, Szolcsányi, J.: Noxious heat threshold temperature and pronociceptive effects of allyl isothiocyanate (mustard oil) in TRPV1 or TRPA1 gene-deleted mice.
Life Sciences, 154:66-74, 2016.
7. Bölcskei, K., Tékus, V., Dézsi, L., Szolcsányi, J., **Pethő, G.**: Antinociceptive desensitizing actions of TRPV1 receptor agonists capsaicin, resiniferatoxin and N-oleoyldopamine as measured by determination of the noxious heat and cold thresholds in the rat.
European Journal of Pain, 14:480-486, 2010.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Ahern GP. Activation of TRPV1 by the satiety factor oleoylethanolamide. *J Biol Chem* 278:30429–30434, 2003.
- Ahluwalia J, Rang H, Nagy I. The putative role of vanilloid receptor-like protein-1 in mediating high threshold noxious heat-sensitivity in rat cultured primary sensory neurons. *Eur J Neurosci* 16:1483–1489, 2002.
- Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Nagy I. Anandamide regulates neuropeptide release from capsaicin-sensitive primary sensory neurons by activating both the cannabinoid 1 receptor and the vanilloid receptor 1 in vitro. *Eur J Neurosci* 17:2611–2618, 2003.
- Albin KC, Carstens MI, Carstens E. Modulation of oral heat and cold pain by irritant chemicals. *Chem Senses* 33:3–15, 2008.
- Alpizar YA, Boonen B, Gees M, Sanchez A, Nilius B, Voets T, Talavera K. Allyl isothiocyanate sensitizes TRPV1 to heat stimulation. *Pflügers Arch* 466:507–515, 2014.
- Amabeoku GJ, Green I, Eagles P, Benjeddou M. Effects of *Tarchonanthus camphoratus* and *Eriocephalus africanus* on nociception in mice and pyrexia in rats. *Phytomedicine* 7:517–522, 2000.
- Amadesi S, Nie J, Vergnolle N, Cottrell GS, Grady EF, Trevisani M, Manni C, Geppetti P, McRoberts JA, Ennes H, Davis JB, Mayer EA, Bunnett NW. Protease-activated receptor 2 sensitizes the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid receptor 1 to induce hyperalgesia. *J Neurosci* 24:4300–4312, 2004.
- Amann R, Maggi CA. Ruthenium red as a capsaicin antagonist. *Life Sci* 49:849–856, 1991.
- Anand P, Bley K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br J Anaesth* 107:490–502, 2011.
- Anker SI. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. *Eur J Pharmacol* 27:1–4, 1974.
- Babes A, Zorzon D, Reid G. Two populations of cold-sensitive neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation by nerve growth factor. *Eur J Neurosci* 20:2276–2282, 2004.
- Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci* 43:42–51, 2004.
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron* 41:849–857, 2004.
- Banik RK, Brennan TJ. Spontaneous discharge and increased heat sensitivity of rat C-fiber nociceptors are present in vitro after plantar incision. *Pain* 112:204–213, 2004.
- Banik RK, Brennan TJ. TRPV1 mediates spontaneous firing and heat sensitization of cutaneous primary afferents after plantar incision. *Pain* 141:41–51, 2009.
- Banks WA, Kastin AJ. Peptide transport systems for opiates across the bloodbrain barrier. *Am J Physiol* 259:E1–E10, 1990.
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* 124:1269–1282, 2006.
- Bautista DM, Siemens J, Glazer JM, Tsuruda PR, Basbaum AI, Stucky CL, Jordt SE, Julius D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448:204–208, 2007.
- Ben-Bassat J, Peretz E, Sulman FG. Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 122:434–447, 1959.
- Benoist JM, Pinedé I, Ballantyne K, Plaghki L, Le Bars D. Peripheral and central determinants of a nociceptive reaction: an approach to psychophysics in the rat. *PLoS One* 3:e3125, 2008.
- Berg J, Fellner H, Christoph T, Kremminger P, Hartmann M, Blaschke H, Rovinsky F, Towart R, Stimmeder D. Pharmacology of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, HN-56249: a novel compound exhibiting a marked preference for the human enzyme in intact cells. *N-S Arch Pharmacol* 361:363–372, 2000.
- Berge OG, Garcia-Cabrera I, Hole K. Response latencies in the tail-flick test depend on tail skin temperature. *Neurosci Lett* 86:284–288, 1988.
- Bessou P, Perl ER. Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol* 32:1025–1043, 1969.
- Bevan SJ, Hothi S, Hughes G, James IF, Rang HP. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. *Br J Pharmacol* 107:544–552, 1992.
- Bhave G, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW IV. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron* 35:721–731, 2002.
- Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RW 4th. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12480–12485, 2003.
- Bianchi M, Panerai AE. The dose-related effects of paracetamol on hyperalgesia and nociception in the rat. *Br J Pharmacol* 117:130–132, 1996.
- Biddlestone L, Corbett AD, Dolan S. Oral administration of Ginkgo biloba extract, EGb-761 inhibits thermal hyperalgesia in rodent models of inflammatory and post-surgical pain. *Br J Pharmacol* 151:285–291, 2007.

- Birrell GJ, McQueen DS, Iggo A, Grubb BD. Prostanoid-induced potentiation of the excitatory and sensitizing effects of bradykinin on articular mechanonociceptors in the rat ankle joint. *Neuroscience* 54:537–544, 1993.
- Bittner MA, Lahann TR. Biphasic time-course of capsaicin-induced substance P depletion: failure to correlate with thermal analgesia in the rat. *Brain Res* 322:305–309, 1984.
- Bjorkman R, Hedner J, Hedner T, Henning M. Central, naloxone-reversible antinociception by diclofenac in the rat. *N-S Arch Pharmacol* 342:171–176, 1990.
- Bonet IJ, Fischer L, Parada CA, Tambeli CH. The role of transient receptor potential A 1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. *Neuropharmacology* 65:206–212, 2013.
- Bonnington JK, McNaughton PA. Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. *J Physiol* 551:433–446, 2003.
- Bonnycastle DD, Cook L, Ipsen J. The action of some analgesic drugs in intact and chronic spinal rats. *Acta Pharmacol Toxicol* 9:332–336, 1953.
- Bourke DL. Counter-irritation reduces pain during cutaneous needle insertion. *Anesth Analg* 64:379, 1985.
- Bölskei K, Helyes Z, Szabó Á, Sándor K, Elekes K, Németh J, Almási R, Pintér E, Pethő G, Szolcsányi J. Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice. *Pain* 117:368–376, 2005.
- Brennan TJ, Vandermeulen EP, Gebhart GF. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain* 64:493–501, 1996.
- Bretag A. Synthetic interstitial fluid for isolated mammalian tissue. *Life Sci* 8:319–329, 1969.
- Brock JA, McLachlan EM, Belmonte C. Tetrodotoxin-resistant impulses in single nociceptor nerve terminals in guinea-pig cornea. *J Physiol* 512:211–217, 1998.
- Bromm B, Jahnke MT, Treede RD. Responses of human cutaneous afferents to CO₂ laser stimuli causing pain. *Exp Brain Res* 55:158–166, 1984.
- Brown AG, Iggo A. A quantitative study of cutaneous receptors and afferent fibres in the cat and rabbit. *J Physiol* 193:707–733, 1967.
- Brune K, Beck WS, Geisslinger G, Menzel-Soglowek S, Peskar BM, Peskar BA. Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition. *Experientia* 47:257–261, 1991.
- Buettner K. Effects of extreme heat and cold on human skin. II. Surface temperature, pain and heat conductivity in experiments with radiant heat. *J Appl Physiol* 3:703–713, 1951.
- Bukhari IA, Khan RA, Gilani AH, Ahmed S, Saeed SA. Analgesic, anti-inflammatory and anti-platelet activities of the methanolic extract of *Acacia modesta* leaves. *Inflammopharmacol* 18:187–196, 2010.
- Burgess PR, Perl ER. Myelinated afferent fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. *J Physiol* 190:541–562, 1967.
- Burgess GM, Mullaney I, Mcneil M, Dunn PM, Rang HP. Second messengers involved in the mechanism of action of bradykinin in sensory neurons in culture. *J Neurosci* 9:3314–3325, 1989.
- Cain DM, Khasabov SG, Simone DA. Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study. *J Neurophysiol* 85:1561–1574, 2001.
- Campbell JN, LaMotte RH. Latency to detection of first pain. *Brain Res* 266:203–208, 1983.
- Campero M, Serra J, Ochoa JL. C-polymodal nociceptors activated by noxious low temperature in human skin. *J Physiol* 497:565–572, 1996.
- Caputo A, Caci E, Ferrera L, Pedemonte N, Barsanti C, Sondo E, Pfeffer U, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galletta LJ. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* 322:590–594, 2008.
- Carlton SM, Coggeshall RE. Immunohistochemical localization of enkephalin in peripheral sensory axons in the rat. *Neurosci Lett* 221:121–124, 1997.
- Carlton SM, Du J, Davidson E, Zhou S, Coggeshall RE. Somatostatin receptors on peripheral primary afferent terminals: inhibition of sensitized nociceptors. *Pain* 90:233–244, 2001a.
- Carlton SM, Du J, Zhou S, Coggeshall RE. Tonic control of peripheral cutaneous nociceptors by somatostatin receptors. *J Neurosci* 21:4042–4049, 2001b.
- Carlton SM, Zhou S, Kraemer B, Coggeshall RE. A role for peripheral somatostatin receptors in counter-irritation-induced analgesia. *Neuroscience* 120:499–508, 2003.
- Carlton SM. Nociceptive primary afferents: they have a mind of their own. *J Physiol* 592:3403–3411, 2014.
- Carney SA, Hall M, Ricketts CR. The adenosine triphosphate content and lactic acid production of guinea-pig skin after mild heat damage. *Br J Dermatol* 94:291–294, 1976.
- Carroll MN. The effect of injury in nociceptive tests employed in analgetic assays. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 123:48–57, 1959.
- Carstens E, Wilson C. Rat tail flick reflex: magnitude measurement of stimulus-response function, suppression by morphine and habituation. *J Neurophysiol* 70:630–639, 1993.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816–824, 1997.
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436–441, 1999.

- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitze KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306–313, 2000.
- Cesare P, McNaughton P. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:15435–15439, 1996.
- Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, McNaughton PA. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron* 23:617–624, 1999.
- Chen Y, Yang C, Wang ZJ. Proteinase-activated receptor 2 sensitizes transient receptor potential vanilloid 1, transient receptor potential vanilloid 4, and transient receptor potential ankyrin 1 in paclitaxel-induced neuropathic pain. *Neuroscience* 193:440–51, 2011.
- Chizh BA, O'Donnell MB, Napolitano A, Wang J, Brooke AC, Aylott MC, Bullman JN, Gray EJ, Lai RY, Williams PM, Appleby JM. The effects of the TRPV1 antagonist SB-705498 on TRPV1 receptor-mediated activity and inflammatory hyperalgesia in humans. *Pain* 132:132–141, 2007.
- Chizh BA, Sang CN. Use of sensory methods for detecting target engagement in clinical trials of new analgesics. *Neurotherapeutics* 6:749–754, 2009.
- Cho H, Yang YD, Lee J, Lee B, Kim T, Jang Y, Back SK, Na HS, Harfe BD, Wang F, Raouf R, Wood JN, Oh U. The calcium-activated chloride channel anoctamin 1 acts as a heat sensor in nociceptive neurons. *Nat Neurosci* 27:1015–1021, 2012.
- Cholewinski A, Burgess GM, Bevan S. The role of calcium in capsaicin-induced desensitization in rat cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 55:1015–1023, 1993.
- Chopra B, Giblett S, Little JG, Donaldson LF, Tate S, Evans RJ, Grubb BD. Cyclooxygenase-1 is a marker for a subpopulation of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* 12:911–920, 2000.
- Chu CJ, Huang SM, De Petrocellis L, Bisogno T, Ewing SA, Miller JD, Zipkin RE, Daddario N, Appendino G, Di Marzo V, Walker JM. N-oleoyldopamine, a novel endogenous capsaicin-like lipid that produces hyperalgesia. *J Biol Chem* 278:13633–13639, 2003.
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt S-E, Basbaum AI, Chao MV, Julius D. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns[4,5]P₂-mediated inhibition. *Nature* 411: 957–962, 2001.
- Chung MK, Lee H, Caterina MJ. Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J Biol Chem* 278:32037–32046, 2003.
- Cleland CL, Lim FY, Gebhart GF. Pentobarbital prevents the development of C fiber-induced hyperalgesia in the rat. *Pain* 57:31–43, 1994.
- Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, Ford AP. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407:1011–1015, 2000.
- Coderre TJ, Melzack R. Cutaneous hyperalgesia: contributions of the peripheral and central nervous systems to the increase in pain sensitivity after injury. *Brain Research* 404:95–106, 1987.
- Colburn RW, Lubin ML, Stone DJ Jr, Wang Y, Lawrence D, D'Andrea MR, Brandt MR, Liu Y, Flores CM, Qin N. Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54:379–386, 2007.
- Corsi MM, Ticozzi C, Netti C, Fulgenzi A, Tiengo M, Gaja G, Guidobono F, Ferrero ME. The effect of somatostatin on experimental inflammation in rats. *Anesth Analg* 85:1112–1115, 1997.
- Crandall M, Kwash J, Yu W, White G. Activation of protein kinase C sensitizes human VR1 to capsaicin and to moderate decreases in pH at physiological temperatures in *Xenopus* oocytes. *Pain* 98:109–117, 2002.
- Cui M, Nicol GD. Cyclic AMP mediates the prostaglandin E2-induced potentiation of bradykinin excitation in rat sensory neurons. *Neuroscience* 66:459–466, 1995.
- Dalsgaard CJ, Jernbeck J, Stains W, Kjartansson J, Haegerstrand A, Hökfelt T, Brodin E, Cuello AC, Brown JC. Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in nerve fibers in the human skin. Relation to fibers containing substance P-, somatostatin- and vasocactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity. *Histochemistry* 91:35–38, 1989.
- D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72:74–79, 1941.
- Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183–187, 2000.
- Davis KD, Pope GE. Noxious cold evokes multiple sensations with distinct time courses. *Pain* 98:179–185, 2002.
- De Petrocellis L, Harrison S, Bisogno T, Tognetto M, Brandi I, Smith GD, Creminon C, Davis JB, Geppetti P, Di Marzo V. The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 77:1660–1663, 2001.
- del Camino D, Murphy S, Heiry M, Barrett LB, Earley TJ, Cook CA, Petrus MJ, Zhao M, D'Amours MD, Deering N, Brenner GJ, Costigan M, Hayward NJ, Chong JA, Fanger CM, Woolf CJ, Patapoutian A, Moran MM. TRPA1 contributes to cold hypersensitivity. *J Neurosci* 10:15165–15174, 2010.
- Dhaka A, Viswanath V, Patapoutian A. TRP ion channels and temperature sensation. *Ann Rev Neurosci* 29:135–161, 2006.

- Dhaka A, Murray AN, Mathur J, Earley TJ, Petrus MJ, Patapoutian A. TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* 54:371–378, 2007.
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol Sci* 22:346–349, 2001.
- Dickenson AH, Dray A. Selective antagonism of capsaicin by capsazepine: evidence for a spinal receptor site in capsaicin-induced antinociception. *Br J Pharmacol* 104:1045–1049, 1991.
- Dirajlal S, Pauers LE, Stucky CL. Differential response properties of IB(4)-positive and -negative unmyelinated sensory neurons to protons and capsaicin. *J Neurophysiol* 89:513–524, 2003.
- Dirig DM, Isakson PC, Yaksh TL. Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 285:1031–1038, 1998.
- Docherty RJ, Yeats JC, Bevan S, Boddeke HW. Inhibition of calcineurin inhibits the desensitization of capsaicin-evoked currents in cultured dorsal root ganglion neurones from adult rats. *Pflüger's Archives* 431:828–837, 1996.
- Docherty RJ, Yeats JC, Piper AS. Capsazepine block of voltage-activated calcium channels in adult rat dorsal root ganglion neurones in culture. *Br J Pharmacol* 121:1461–1467, 1997.
- Dogrul A, Gülmez SE, Deveci MS, Gul H, Ossipov MH, Porreca F, Tulunay FC. The local antinociceptive actions of nonsteroidal antiinflammatory drugs in the mouse radiant heat tail-flick test. *Anesth Analg* 104:927–935, 2007.
- Dray A, Forbes CA, Burgess GM. Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurones as well as the activation of peripheral nociceptors in vitro. *Neurosci Lett* 110:52–59, 1990.
- Dray A, Patel IA, Perkins MN, Rueff A. Bradykinin-induced activation of nociceptors: receptor and mechanistic studies on the neonatal rat spinal cord-tail preparation in vitro. *Br J Pharmacol* 107:1129–1134, 1992.
- Dray A. Chemical activation and sensitization of nociceptors. In: *Peripheral neurons in nociception: physiological and pharmacological aspects*. Besson JM, Guilbaud G, Ollat H (eds.) John Libbey Eurotext, Paris, pp. 49–70, 1994.
- Dux M, Sann H, Schemann M, Jancsó G. Changes in fibre populations of the rat hairy skin following selective chemodenervation by capsaicin. *Cell Tissue Res* 296:471–477, 1999.
- Eckert WA 3rd, Julius D, Basbaum AI. Differential contribution of TRPV1 to thermal responses and tissue injury-induced sensitization of dorsal horn neurons in laminae I and V in the mouse. *Pain* 126:184–197, 2006.
- Eid SR. To feel or not to feel – targeting the heat sensor TRPV1 for pain management. *Keystone Meeting on Neurobiology of Pain and Analgesia*, Santa Fe, New Mexico, 2009.
- Eid SR, Crown ED, Moore EL, Liang HA, Choong KC, Dima S, Henze DA, Kane SA, Urban MO. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain* 4:48, 2008.
- Eide PK, Tjølsen A. Effects of serotonin receptor antagonists and agonists on the tail-flick response in mice involve altered tail-skin temperature. *Neuropharmacology* 27:889–893, 1988.
- Engelhardt G, Homma D, Schlegel K, Utzmann R, Schnitzler C. Anti-inflammatory, analgesic, antipyretic and related properties of meloxicam, a new non-steroidal antiinflammatory agent with favorable gastrointestinal tolerance. *Inflamm Res* 44:423–433, 1995.
- England S, Bevan S, Docherty RJ. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J Physiol (Lond.)* 495:429–440, 1996.
- El Bitar N, Pollin B, Karroum E, Pinedé I, Mouraux A, Le Bars D. Thermoregulatory vasomotor tone of the rat tail and paws in thermoneutral conditions and its impact on a behavioral model of acute pain. *J Neurophysiol* 112:2185–2198, 2014.
- El Bitar N, Pollin B, Karroum E, Pinedé I, Le Bars D. Entanglement between thermoregulation and nociception in the rat: the case of morphine. *J Neurophysiol* 116:2473–2496, 2016.
- Ercoli N, Lewis MN. Studies on analgesics. *J Pharmacol Exp Ther* 84:301–317, 1945.
- Evans AR, Vasko MR, Nicol GD. The cAMP transduction cascade mediates the PGE2-induced inhibition of potassium currents in rat sensory neurones. *J Physiol (Lond.)* 516:163–178, 1999.
- Everaerts W, Gees M, Alpizar YA, Farre R, Leten C, Apetrei A, Dewachter I, van Leuven F, Vennekens R, De Ridder D, Nilius B, Voets T, Talavera K. The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil. *Curr Biol* 21:316–321, 2011.
- Fajardo O, Meseguer V, Belmonte C, Viana F. TRPA1 channels mediate cold temperature sensing in mammalian vagal sensory neurons: pharmacological and genetic evidence. *J Neurosci* 28:7863–7875, 2008.
- Farré AJ, Colombo M, Gutiérrez B. Maximum tolerated temperature in the rat tail: a broadly sensitive test of analgesic activity. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 11:303–307, 1989.
- Ferrari LF, Gear RW, Levine JD. Attenuation of activity in an endogenous analgesia circuit by ongoing pain in the rat. *J Neurosci* 30:13699–13706, 2010.
- Ferreira SH, Lorenzetti BB, Correa FM. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. *Eur J Pharmacol* 53:39–48, 1978.
- Fialip J, Porteix A, Marty H, Eschalier A, Duchêne-Marullaz P. Lack of importance of caffeine as an analgesic adjuvant of dipyrone in mice. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 302:86–95, 1989.

- Field MJ, Holloman EF, McCleary S, Hughes J, Singh L. Evaluation of gabapentin and S-(+)-3-isobutylgaba in a rat model of postoperative pain. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1242–1246, 1997.
- Fischer MJ, Reeh PW. Sensitization to heat through G-protein-coupled receptor pathways in the isolated sciatic mouse nerve. *Eur J Neurosci* 25:3570–3575, 2007.
- Forster C, Handwerker HO. Automatic classification and analysis of microneurographic spike data using a PC/AT. *J Neurosci Meth* 31:109–118, 1990.
- Fowler JC, Wonderlin WF, Weinreich D. Prostaglandins block a Ca^{2+} -dependent slow spike afterhyperpolarization independent of effects on Ca^{2+} influx in visceral afferent neurons. *Brain Res* 345:345–349, 1985.
- Fruhstorfer H, Lindblom U, Schmidt WG. Method for quantitative estimation of thermal thresholds in patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 39:1071–1075, 1976.
- Gamble GD, Milne RJ. Repeated exposure to sham testing procedures reduces reflex withdrawal and hot-plate latencies: attenuation of tonic descending inhibition? *Neurosci Lett* 96:312–317, 1989.
- Gammon GD, Starr I. Studies on the relief of pain by counterirritation. *J Clin Invest* 20:13–20, 1941.
- Gamse R. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. *N-S Arch Pharmacol* 320:205–216, 1982.
- García-Martínez C, Humet M, Planells-Cases R, Gomis A, Caprini M, Viana F, De La Pena E, Sanchez-Baeza F, Carbonell T, De Felipe C, Pérez-Paya E, Belmonte C, Messeguer A, Ferrer-Montiel A. Attenuation of thermal nociception and hyperalgesia by VR1 blockers. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2374–2379, 2002.
- Gavva NR, Tamir R, Qu Y, Klionsky L, Zhang TJ, Immke D, Wang J, Zhu D, Vanderah TW, Porreca F, Doherty EM, Norman MH, Wild KD, Bannon AW, Louis JC, Treanor JJ. AMG 9810 [(E)-3-(4-t-butylphenyl)-N-(2, 3-dihydrobenzo[b][1, 4]-dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 313:474–484, 2005.
- Gear RW, Aley KO, Levine JD. Pain-induced analgesia mediated by mesolimbic reward circuits. *J Neurosci* 19:7175–7181, 1999.
- Gees M, Alpizar YA, Boonen B, Sanchez A, Everaerts W, Segal A, Xue F, Janssens A, Owsianik G, Nilius B, Voets T, Talavera K. Mechanisms of transient receptor potential vanilloid 1 activation and sensitization by allyl isothiocyanate. *Mol Pharmacol* 84:325–334, 2013.
- Geisslinger G, Menzel-Soglowek S, Beck WS, Brune K. R-flurbiprofen: isomeric ballast or active entity of the racemic compound? *Agents Actions Suppl* 44:31–36, 1993.
- Geisslinger G, Muth-Selbach U, Coste O, Vetter G, Schrodter A, Schaible HG, Brune K, Tegeder I. Inhibition of noxious stimulus-induced spinal prostaglandin E2 release by flurbiprofen enantiomers: a microdialysis study. *J Neurochem* 74:2094–2100, 2000.
- Gelgor L, Butkow N, Mitchell D. Effects of systemic non-steroidal anti-inflammatory drugs on nociception during tail ischaemia and on reperfusion hyperalgesia in rats. *Br J Pharmacol* 105:412–416, 1992.
- Gentry C, Stoakley N, Andersson DA, Bevan S. The roles of iPLA2, TRPM8 and TRPA1 in chemically induced cold hypersensitivity. *Mol Pain* 6:4, 2010.
- Gilchrist HD, Allard BL, Simone DA. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain* 67:179–188, 1996.
- Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, Levine JD. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na^{+} current in nociceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1108–1112, 1996a.
- Gold MS, Shuster MJ, Levine JD. Role of a Ca^{2+} -dependent slow afterhyperpolarization in prostaglandin E2-induced sensitization of cultured rat sensory neurons. *Neurosci Lett* 205:161–164, 1996b.
- Gold MS, Levine JD, Correa AM. Modulation of TTX-R I_{Na} by PKC and PKA and their role in PGE2-induced sensitization of rat sensory neurons in vitro. *J Neurosci* 18:10345–10355, 1998.
- Gopinath P, Wan E, Holdcroft A, Facer P, Davis JB, Smith GD, Bountra C, Anand P. Increased capsaicin receptor TRPV1 in skin nerve fibres and related vanilloid receptors TRPV3 and TRPV4 in keratinocytes in human breast pain. *BMC Womens Health* 5:2, 2005.
- Gover TD, Kao JPY, Weinreich D. Calcium signaling in single peripheral sensory nerve terminals. *J Neurosci* 23:4793–4797, 2003.
- Groves PM, Thompson RF. Habituation: a dual process theory. *Psychol Rev* 77:419–450, 1970.
- Gu Q, Kwong K, Lee LY. Ca^{2+} transient evoked by chemical stimulation is enhanced by PGE2 in vagal sensory neurons: role of cAMP/PKA signaling pathway. *J Neurophysiol.* 89:1985–1993, 2003.
- Guieu R, Serratrice G, Pouget J. Counter irritation test in primary fibromyalgia. *Clin Rheumatol* 13:605–610, 1994.
- Guo Z-L, Symons JD, Longhurst JC. Activation of visceral afferents by bradykinin and ischemia: independent roles of PKC and prostaglandins. *Am J Physiol* 276:H1884–H1891, 1999.
- Guo Y, Yao FR, Cao DY, Pickar JG, Zhang Q, Wang HS, Zhao Y. Somatostatin inhibits activation of dorsal cutaneous primary afferents induced by antidromic stimulation of primary afferents from an adjacent thoracic segment in the rat. *Brain Res* 1229:61–71, 2008.
- Güler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* 22:6408–6414, 2002.
- Günther S, Reeh PW, Kress M. Rises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediate capsaicin- and proton-induced heat sensitization of rat primary nociceptive neurons. *Eur J Neurosci* 11:3143–3150, 1999.

- Hall JM. Bradykinin receptors. *Gen. Pharmacol* 28:1–6, 1997.
- Hamilton SG, Wade A, McMahon SB. The effects of inflammation and inflammatory mediators on nociceptive behaviour induced by ATP analogues in the rat. *Br J Pharmacol* 126:326–332, 1999.
- Hamura H, Yoshida M, Shimizu K, Matsukura T, Suzuki H, Narita M, Suzuki T. Antinociceptive effect of the combination of pentazocine with morphine in the tail-immersion and scald-pain tests in rats. *Jpn J Pharmacol* 83:286–292, 2000.
- Hardy JD, Wolff HG, Goodell H. Studies on pain. A new method for measuring pain threshold: observation on spatial summation of pain. *J Clin Invest* 19:649–657, 1940.
- Hardy JD, Wolff HG, Goodell H. Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J Clin Invest* 29:115–140, 1950.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32:77–88, 1988.
- Harris AG. Somatostatin and somatostatin analogues: pharmacokinetics and pharmacodynamic effects. *Gut* 35:S1–S4, 1994.
- Hayes AG, Tyers MB. Effects of capsaicin on nociceptive heat, pressure and chemical thresholds and on substance P levels in the rat. *Brain Res* 189:561–564, 1980.
- Helyes Z, Thán M, Oroszi G, Pintér E, Németh J, Kéri G, Szolcsányi J. Anti-nociceptive effect induced by somatostatin released from sensory nerve terminals and by synthetic somatostatin analogues in the rat. *Neurosci Lett* 278:185–188, 2000.
- Helyes Z, Németh J, Thán M, Bölcskei K, Pintér E, Szolcsányi J. Inhibitory effect of anandamide on resiniferatoxin-induced sensory neuropeptide release in vivo and neuropathic hyperalgesia in the rat. *Life Sci* 73:2345–2353, 2003.
- Helyes Z, Szabó A, Németh J, Jakab B, Pintér E, Bánvölgyi A, Kereskai L, Kéri G, Szolcsányi J. Antiinflammatory and analgesic effects of somatostatin released from capsaicin-sensitive sensory nerve terminals in a Freund's adjuvant-induced chronic arthritis model in the rat. *Arthritis Rheum* 50, 1677–1685, 2004.
- Helyes Z, Pintér E, Sándor K, Elekes K, Bánvölgyi A, Keszthelyi D, Szőke E, Tóth DM, Sándor Z, Kereskai L, Pozsgai G, Allen JP, Emson PC, Markovics A, Szolcsányi J. Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc Natl Acad Sci. USA* 106:13088–13093, 2009.
- Heppelmann B, Pawlak M. Inhibitory effect of somatostatin on the mechanosensitivity of articular afferents in normal and inflamed knee joints of the rat. *Pain* 73:377–382, 1997.
- Hingtgen CM, Waite KJ, Vasko MR. Prostaglandins facilitate peptide release from rat sensory neurons by activating the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate transduction cascade. *J Neurosci* 15:5411–5419, 1995.
- Hoffmann T, Kistner K, Miermeister F, Winkelmann R, Wittmann J, Fischer MJ, Weidner C, Reeh PW. TRPA1 and TRPV1 are differentially involved in heat nociception of mice. *Eur J Pain* 17:1472–1482, 2013.
- Honoré P, Wismer CT, Mikusa J, Zhu CZ, Zhong C, Gauvin DM, Gomtsyan A, El Kouhen R, Lee CH, Marsh K, Sullivan JP, Faltynek CR, Jarvis MF. A-425619 [1-isoquinolin-5-yl-3-(4-trifluoromethyl-benzyl)-urea], a novel transient receptor potential type V1 receptor antagonist, relieves pathophysiological pain associated with inflammation and tissue injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 314:410–421, 2005.
- Honoré P, Chandran P, Hernandez G, Gauvin DM, Mikusa JP, Zhong C, Joshi SK, Ghilardi JR, Sevcik MA, Fryer RM, Segreti JA, Banfor PN, Marsh K, Neelands T, Bayburt E, Daanen JF, Gomtsyan A, Lee CH, Kort ME, Reilly RM, Surowy CS, Kym PR, Mantyh PW, Sullivan JP, Jarvis MF, Faltynek CR. Repeated dosing of ABT-102, a potent and selective TRPV1 antagonist, enhances TRPV1-mediated analgesic activity in rodents, but attenuates antagonist-induced hyperthermia. *Pain* 142:27–35, 2009.
- Horváth K, Boros M, Bagoly T, Sándor V, Kilár F, Kemény A, Helyes Z, Szolcsányi J, Pintér E. Analgesic topical capsaicinoid therapy increases somatostatin-like immunoreactivity in the human plasma. *Neuropeptides* 48:371–378, 2014.
- Hökfelt T, Elde R, Johansson O, Luft R, Nilsson G, Arimura A. Immunohistochemical evidence for separate populations of somatostatin-containing and substance P-containing primary afferent neurons in the rat. *Neuroscience* 1:131–136, 1976.
- Hu HJ, Bhawe G, Gereau RW IV. Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. *J Neurosci* 22:7444–7452, 2002.
- Huang LYM, Neher E. Ca²⁺ dependent exocytosis in the somata of dorsal root ganglion neurons. *Neuron* 17:135–145, 1996.
- Huang SM, Li X, Yu Y, Wang J, Caterina MJ. TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol Pain* 7:37, 2011.
- Hunskar S, Berge O-G, Hole K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. *Behav Brain Res* 21:101–108, 1986.
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances. *Proc Nat Acad Sci USA* 97:6155–6160, 2000.

- Irwin S, Houde RW, Bennett DR, Hendershot LC, Steevers MH. The effects of morphine, methadone and meperidine on some reflex responses of spinal animals to nociceptive stimulation. *J Pharmacol Exp Ther* 101:132–143, 1951.
- Jancsó N, Jancsó-Gábor A, Szolcsányi J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol* 31:138–151, 1967.
- Jarvis MF, Wismer CT, Schweitzer E, Yu H, van Biesen T, Lynch KJ, Burgard EC, Kowaluk EA. Modulation of BzATP and formalin induced nociception: attenuation by the P2X receptor antagonist, TNP-ATP and enhancement by the P2X(3) allosteric modulator, cibacron blue. *Br J Pharmacol* 132:259–269, 2001.
- Jerman JC, Brough SJ, Prinjha R, Harries MH, Davis JB, Smart D. Characterization using FLIPR of rat vanilloid receptor (rVR1) pharmacology. *Br J Pharmacol* 130:916–922, 2000.
- Ji GC, Zhou ST, Shapiro G, Reubi JC, Jurczyk S, Carlton SM. Analgesic activity of a non-peptide imidazolidinedione somatostatin agonist: in vitro and in vivo studies in rat. *Pain* 124:34–49, 2006.
- Jóó F, Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A. Mitochondrial alterations in the spinal ganglion cells of the rat accompanying the long-lasting sensory disturbance induced by capsaicin. *Life Sci* 8:621–626, 1969.
- Jordt SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* 427:260–265, 2004.
- Jung J, Shin JS, Lee SY, Hwang SW, Koo J, Cho H, Oh U. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem* 279:7048–7054, 2004.
- Karai L, Brown DC, Mannes AJ, Connelly ST, Brown J, Gandal M, Wellisch OM, Neubert JK, Olah Z, Iadarola MJ. Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *J Clin Invest* 113:1344–1352, 2004.
- Karashima Y, Talavera K, Everaerts W, Janssens A, Kwan KY, Vennekens R, Nilius B, Voets T. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 4:1273–1278, 2009.
- Kashiba H, Ueda Y, Senba E. Coexpression of preprotachykinin-A, alphacalcitonin gene-related peptide, somatostatin, and neurotrophin receptor family messenger RNAs in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci* 70:179–189, 1996.
- Katsura H, Obata K, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Sakagami M, Noguchi K. Antisense knock down of TRPA1, but not TRPM8, alleviates cold hyperalgesia after spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol* 200:112–123, 2006.
- Kawakita K, Funakoshi M. A quantitative study on the tail flick test in the rat. *Physiol Behav* 39:235–240, 1987.
- Kenshalo DR, Bergen DC. A device to measure cutaneous temperature sensitivity in humans and subhuman species. *J Appl Physiol* 39:1038–1040, 1975.
- Kerstein PC, del Camino D, Moran MM, Stucky CL. Pharmacological blockade of TRPA1 inhibits mechanical firing in nociceptors. *Mol Pain* 5:19, 2009.
- Kessler F, Habelt C, Averbeck B, Reeh PW, Kress M. Heat-induced release of CGRP from isolated rat skin and effects of bradykinin and the protein kinase C activator PMA. *Pain* 83:289–295, 1999.
- Khan AA, Raja SN, Manning DC, Campbell JN, Meyer RA. The effects of bradykinin and sequence-related analogs on the response properties of cutaneous nociceptors in monkeys. *Somatosens Mot Res* 9:97–106, 1992.
- Khasar SG, Gold MS, Levine JD. Atetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat. *Neurosci Lett* 256:17–20, 1998.
- Kichko TI, Reeh PW. TRPV1 controls acid- and heat-induced calcitonin gene-related peptide release and sensitization by bradykinin in the isolated mouse trachea. *Eur J Neurosci* 29:1896–1904, 2009.
- Kilo S, Forster C, Geisslinger G, Brune K, Handwerker HO. Inflammatory models of cutaneous hyperalgesia are sensitive to effects of ibuprofen in man. *Pain* 62:187–193, 1995.
- Kirschstein T, Büsselberg D, Treede RD. Coexpression of heat-evoked and capsaicin-evoked inward currents in acutely dissociated rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 231:33–36, 1997.
- Kirschstein T, Greffrath W, Büsselberg D, Treede RD. Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory neurons of rats by vanilloid receptor antagonists. *J Neurophysiol* 82:2853–2860, 1999.
- Knihnicki RD, Williams KM, Day RO. Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs–1. In vitro studies of ibuprofen and flurbiprofen. *Biochem Pharmacol* 38:4389–4395, 1989.
- Knoll J, Kelemen K, Knoll B. Experimental studies on the higher nervous activity of animals. I. A method for the elaboration of a non-extinguishable conditioned reflex in the rat. *Acta Physiol Hung* 8:327–344, 1955.
- Knowlton WM, Bifulco-Fisher A, Bautista DM, McKemy DD. TRPM8, but not TRPA1, is required for neural and behavioral responses to acute noxious cold temperatures and cold-mimetics in vivo. *Pain* 150:340–350, 2010.
- Knowlton WM, Palkar R, Lippoldt EK, McCoy DD, Baluch F, Chen J, McKemy DD. A sensory-labeled line for cold: TRPM8-expressing sensory neurons define the cellular basis for cold, cold pain, and cooling-mediated analgesia. *J Neurosci* 33:2837–2848, 2013.
- Koltzenburg M, Kress M, Reeh PW. The nociceptor sensitization by bradykinin does not depend on sympathetic neurones. *Neurosci* 46:465–473, 1992a.
- Koltzenburg M, Lundberg LE, Torebjörk HE. Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin. *Pain* 51:207–219, 1992b.

- Koltzenburg M, Torebjörk HE, Wahren LK. Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain. *Brain* 117:579–591, 1994.
- Koltzenburg M, Stucky CL, Lewin GR. Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin. *J Neurophysiol* 78:1841–1850, 1997.
- Koplas PA, Rosenberg RL, Oxford GS. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 17:3525–3537, 1997.
- Kouadio F, Kanko C, Juge M, Grimaud N, Jean A, N'Guessan YT, Petit JY. Analgesic and antiinflammatory activities of an extract from *Parkia biglobosa* used in traditional medicine in the Ivory Coast. *Phytother Res* 14:635–637, 2000.
- Kress M, Rödl J, Reeh PW. Stable analogues of cyclic AMP but not cyclic GMP sensitize unmyelinated primary afferents in rat skin to heat stimulation but not to inflammatory mediators, in vitro. *Neurosci* 74:609–617, 1996.
- Kress M, Günther S. Role of Ca^{2+} in the ATP-induced heat sensitization process of rat nociceptive neurons. *J Neurophysiol* 81:2612–2619, 1999.
- Kumazawa T, Mizumura K, Sato J. Response properties of polymodal receptors studied using in vitro testis superior spermatic nerve preparations of dog. *J Neurophysiol* 57:702–711, 1987.
- Kumazawa T, Mizumura K, Minagawa M, Tsujii Y. Sensitizing effects of bradykinin on the heat responses of the visceral nociceptor. *J Neurophysiol* 66:1819–1824, 1991.
- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang DS, Woolf CJ, Corey DP. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 50:277–289, 2006.
- Kwan KY, Glazer JM, Corey DP, Rice FL, Stucky CL. TRPA1 modulates mechanotransduction in cutaneous sensory neurons. *J Neurosci* 29:4808–4819, 2009.
- Kwong K, Lee LY. Prostaglandin E2 potentiates a TTX-resistant sodium current in rat capsaicin-sensitive vagal pulmonary sensory neurones. *J Physiol* 564:437–450, 2005.
- LaMotte RH, Thalhammer JG. Response properties of high-threshold cutaneous cold receptors in the primate. *Brain Res* 244:279–287, 1982.
- LaMotte RH, Thalhammer JG, Torebjörk HE, Robinson CJ. Peripheral neural mechanisms of cutaneous hyperalgesia following mild injury by heat. *J Neurosci* 2:765–781, 1982.
- LaMotte RH, Lundberg LE, Torebjörk HE. Pain, hyperalgesia and activity in nociceptive C units in humans after intradermal injection of capsaicin. *J Physiol* 448:749–764, 1992.
- Lang E, Novak P, Reeh PW, Handwerker HO. Chemosensitivity of fine afferents from rat skin in vitro. *J Neurophysiol* 63:887–901, 1990.
- Lawson SN. Neuropeptides in morphologically and functionally identified primary afferent neurons in dorsal root ganglia: substance P, CGRP and somatostatin. *Prog Brain Res* 104:161–173, 1995.
- Lawson SN. Peptides and cutaneous polymodal nociceptor neurones. *Prog Brain Res* 113:369–385, 1996.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 53:597–652, 2001.
- Le Bars D. The whole body receptive field of dorsal horn multireceptive neurones. *Brain Res Rev* 40:29–44, 2002.
- Lee B, Cho H, Jung J, Yang YD, Yang DJ, Oh U. Anoctamin 1 contributes to inflammatory and nerve-injury induced hypersensitivity. *Mol Pain* 10:5, 2014.
- Lee H, Iida T, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *J Neurosci* 25:1304–1310, 2005.
- Lechner SG, Frenzel H, Wang R, Lewin GR. Developmental waves of mechanosensitivity acquisition in sensory neuron subtypes during embryonic development. *EMBO J* 28:1479–1491, 2009.
- Leem JW, Willis WD, Chung JM. Cutaneous sensory receptors in the rat foot. *J Neurophysiol* 69:1684–1699, 1993.
- Lennertz RC, Kossyrev EA, Smith AK, Stucky CL. TRPA1 mediates mechanical sensitization in nociceptors during inflammation. *PLoS One* 7:e43597, 2012.
- Leonard PA, Arunkumar R, Brennan TJ. Bradykinin antagonists have no analgesic effect on incisional pain. *Anesthesia Analgesia* 99:1166–1172, 2004.
- Levine JD, Taiwo YO. Involvement of the mu-opiate receptor in peripheral analgesia. *Neurosci* 32:571–575, 1989.
- Li L, Luo R, Guo Y, Yao F, Cao D, Ma S, Wang J, Wang H, Zhao Y. The inhibitory effect of somatostatin receptor activation on bee venom-evoked nociceptive behavior and pCREB expression in rats. *Biomed Res Int* 2014:251785, 2014.
- Liang YF, Haake B, Reeh PW. Sustained sensitization and recruitment of rat cutaneous nociceptors by bradykinin and a novel theory of its excitatory action. *J Physiol (Lond.)* 532:229–239, 2001.
- Liedtke W, Friedman JM. Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13698–13703, 2003.
- Liu L, Oortgiesen M, Li L, Simon SA. Capsaicin inhibits activation of voltage-gated sodium currents in capsaicin-sensitive trigeminal ganglion neurons. *J Neurophysiol* 85:745–758, 2001.
- Longordo F, Fan J, Steimer T, Kopp C, Lüthi A. Do mice habituate to “gentle handling?” A comparison of resting behavior, corticosterone levels and synaptic function in handled and undisturbed C57BL/6J mice. *Sleep* 34:679–681, 2011.

- Lopshire JC, Nicol GD. The cAMP transduction cascade mediates the prostaglandin E2 enhancement of the capsaicin-elicited current in rat sensory neurons: whole-cell and single-channel studies. *J Neurosci* 18:6081–6092, 1998.
- LoVerme J, Russo R, La Rana G, Fu J, Farthing J, Mattace-Raso G, Meli R, Hohmann A, Calignano A, Piomelli D. Rapid broad-spectrum analgesia through activation of peroxisome proliferator-activated receptor α . *J Pharmacol Exp Ther* 319:1051–1061, 2006.
- Luttinger D. Determination of antinociceptive efficacy of drugs in mice using different water temperatures in a tail immersion test. *J Pharmacol Methods* 13:351–357, 1985.
- Lyfenko A, Vlachova V, Vyklicky L, Dittert I, Kress M, Reeh PW. The effects of excessive heat on heat-activated membrane currents in cultured dorsal root ganglia neurons from neonatal rat. *Pain* 95:207–214, 2002.
- Lynn B. The fibre composition of cutaneous nerves and the classification and response properties of cutaneous afferents, with particular reference to nociception. *Pain Rev* 1:172–183, 1994.
- Malcangio M. GDNF and somatostatin in sensory neurones. *Curr Opin Pharmacol* 3:41–45, 2003.
- Malmberg AB, Yaksh TL. Antinociception produced by spinal delivery of the S and R enantiomers of flurbiprofen in the formalin test. *Eur J Pharmacol* 256:205–209, 1994.
- Mandadi S, Numazaki M, Tominaga M, Bhat MB, Armati PJ, Roufogalis BD. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* 35:471–478, 2004.
- Marceau F, Bachvarov DR. Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol* 16:385–401, 1998.
- Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50:357–386, 1998.
- Marics I, Malapert P, Reynders A, Gaillard S, Moqrich A. Acute heat-evoked temperature sensation is impaired but not abolished in mice lacking TRPV1 and TRPV3 channels. *PLoS ONE* 9:e99828, 2014.
- Matucci-Cerinic M, Marabini S. Somatostatin treatment for pain in rheumatoid arthritis: a double blind versus placebo study in knee involvement. *Med Sci Res* 16:233–234, 1998.
- Maubach KA, Grundy D. The role of prostaglandins in the bradykinin-induced activation of serosal afferents of the rat jejunum in vitro. *J Physiol (Lond.)* 515:277–285, 1999.
- Mayer S, Izydorczyk I, Reeh PW, Grubb BD. Bradykinin-induced nociceptor sensitisation to heat depends on cox-1 and cox-2 in isolated rat skin. *Pain* 130:14–24, 2007.
- McCormack K. The spinal actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the dissociation between their anti-inflammatory and analgesic effects. *Drugs* 47:28–45, 1994.
- McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52–58, 2002.
- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13525–13530, 2007.
- Meisenberg G, Simmons WH. Minireview. Peptides and the blood-brain barrier. *Life Sci* 32:2611–2623, 1983.
- Melzack R. Prolonged relief of pain by brief, intense transcutaneous somatic stimulation. *Pain* 1:357–373, 1975.
- Menzel-Soglowek S, Geisslinger G, Beck WS, Brune K. Variability of inversion of R-flurbiprofen in different species. *J Pharm Sci* 81:888–891, 1992.
- Merrill AW, Cuellar JM, Judd JH, Carstens MI, Carstens E. Effects of TRPA1 agonists mustard oil and cinnamaldehyde on lumbar spinal wide-dynamic range neuronal responses to innocuous and noxious cutaneous stimuli in rats. *J Neurophysiol* 99:415–425, 2008.
- Meyer RA, Campbell JN. Myelinated nociceptive afferents account for the hyperalgesia that follows a burn to the hand. *Science* 213:1527–1529, 1981.
- Meyer RA, Davis KD, Cohen RH, Treede RD, Campbell JN. Mechanically insensitive afferents (MIAs) in cutaneous nerves of monkey. *Brain Res* 561:252–261, 1991.
- Mickle AD, Shepherd AJ, Mohapatra DP. Sensory TRP channels: the key transducers of nociception and pain. *Prog Mol Biol Transl Sci* 131:73–118, 2015.
- Milano J, Oliveira SM, Rossato MF, Sauzem PD, Machado P, Beck P, Zanatta N, Martins MA, Mello CF, Rubin MA, Ferreira J, Bonacorso HG. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalin and hot-plate tests in mice. *Eur J Pharmacol* 581:86–96, 2008.
- Mizumura K, Sato J, Kumazawa T. Effects of prostaglandins and other putative chemical intermediaries on the activity of canine testicular polymodal receptors studied in vitro. *Pflüger's Archives* 408:565–572, 1987.
- Mizumura K, Minagawa M, Tsujii Y, Kumazawa T. Prostaglandin E2 induced sensitisation of the heat response of canine visceral polymodal receptors in vitro. *Neurosci Lett* 161:117–119, 1993a.
- Mizumura K, Koda H, Kumazawa T. Augmenting effects of cyclic AMP on the heat response of canine testicular polymodal receptors. *Neurosci Lett* 162:75–77, 1993b.
- Mizumura K, Koda H, Kumazawa T. Evidence that protein kinase C activation is involved in the excitatory and facilitatory effects of bradykinin on canine visceral nociceptors in vitro. *Neurosci Lett* 237:29–32, 1997.
- Mogil JS. Animal models of pain: progress and challenges. *Nat Rev Neurosci* 10:283–94, 2009.
- Mohapatra DP, Nau C. Desensitization of capsaicin-activated currents in the vanilloid receptor TRPV1 is decreased by the cyclic AMP-dependent protein kinase pathway. *J Biol Chem* 278:50080–50090, 2003.

- Mohapatra DP, Nau C. Regulation of Ca²⁺-dependent desensitization in the vanilloid receptor TRPV1 by calcineurin and cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 280:13424–13432, 2005.
- Moparthy L, Kichko TI, Eberhardt M, Högestätt ED, Kjellbom P, Johanson U, Reeh PW, Leffler A, Filipovic MR, Zygmunt PM. Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. *Sci Rep* 6:28763, 2016.
- Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, Andahazy M, Story GM, Patapoutian A. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307:1468–1472, 2005.
- Moriyama T, Higashi T, Togashi K, Iida T, Segi E, Sugimoto Y, Tominaga T, Narumiya S, Tominaga M. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Molecular Pain* 1:3, 2005.
- Movahed P, Jönsson Bo AG, Birnir B, Wingstrand JA, Jorgensen TD, Ermund A, Sterner O, Zygmunt PM, Högestätt E. Endogenous unsaturated C18 N-acyl ethanolamines are vanilloid receptor (TRPV1) agonists. *J Biol Chem* 280:38496–38504, 2005.
- Munns C, Al Qatari M, Koltzenburg M. Many cold sensitive peripheral neurons of the mouse do not express TRPM8 or TRPA1. *Cell Calcium* 41:331–342, 2007.
- Nagata K, Duggan A, Kumar G, García-Añoveros J. Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci* 25:4052–4061, 2005.
- Nagy JJ, Hunt SP. Fluoride-resistant acid phosphatase-containing neurones in dorsal root ganglia are separate from those containing substance P or somatostatin. *Neurosci* 7:89–97, 1982.
- Nagy I, Rang HP. Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. *Neurosci* 88:995–997, 1999a.
- Nagy I, Rang HP. Similarities and differences between the responses of rat sensory neurons to noxious heat and capsaicin. *J Neurosci* 19:10647–10655, 1999b.
- Nealen ML, Gold MS, Thut PD, Caterina MJ. TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *J Neurophysiol* 90:515–520, 2003.
- Negus SS, Vanderah TW, Brandt MR, Bilsky EJ, Becerra L, Borsook D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. *J Pharmacol Exp Ther* 319:507–514, 2006.
- Németh J, Helyes Z, Görös T, Gardi J, Pintér E, Szolcsányi J. Development of somatostatin radioimmunoassay for the measurement of plasma and tissue contents of hormone. *Acta Physiol Hung* 84:313–315, 1996.
- Németh J, Helyes Z, Oroszi G, Thán M, Pintér E, Szolcsányi J. Inhibition of nociceptin on sensory neuropeptide release and mast cell-mediated plasma extravasation in rats. *Eur J Pharmacol* 347:101–104, 1998.
- Németh J, Helyes Z, Oroszi G, Jakab B, Pintér E, Szilvássy Z, Szolcsányi J. Role of voltage-gated cation channels and axon reflexes in the release of sensory neuropeptides by capsaicin from isolated rat trachea. *Eur J Pharmacol* 458:313–318, 2003a.
- Németh J, Helyes Z, Thán M, Jakab B, Pintér E, Szolcsányi J. Concentration-dependent dual effect of anandamide on sensory neuropeptide release from isolated rat tracheae. *Neurosci Lett* 336:89–92, 2003b.
- Ness TJ, Jones SL, Gebhart GF. Contribution of the site of heating to the variability in the latency of the rat tail flick reflex. *Brain Res* 426:169–172, 1987.
- Neubert JK, Karai L, Jun JH, Kim HS, Olah Z, Iadarola MJ. Peripherally induced resiniferatoxin analgesia. *Pain* 104:219–228, 2003.
- Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev* 66:676–814, 2014.
- Nolano M, Simone DA, Wendelschafer-Crabb G, Johnson T, Hazen E, Kennedy WR. Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. *Pain* 81:135–145, 1999.
- Nozaki-Taguchi N, Yaksh TL. A novel model of primary and secondary hyperalgesia after mild thermal injury in the rat. *Neurosci Lett* 254:25–28, 1998.
- Nozaki-Taguchi N, Yaksh TL. Spinal and peripheral mu opioids and the development of secondary tactile allodynia after thermal injury. *Anesth. Analg.* 94:968–974, 2002.
- Numazaki M, Tominaga T, Toyooka H, Tominaga M. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase C epsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem* 277:13375–13378, 2002.
- Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Fukuoka T, Tokunaga A, Tominaga M, Noguchi K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* 115:2393–2401, 2005.
- Obál Jr F, Benedek G, Jancsó-Gábor A, Obál F. Salivary cooling, escape reaction and heat pain in capsaicin-desensitized rats. *Pflügers Arch* 382:249–254, 1979.
- Obreja O, Rathee PK, Lips KS, Distler C, Kress M. IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C. *FASEB J* 16:1497–1503, 2002.
- Oden DL, Oden KL. A minimum-stress procedure for repeated measurements of nociceptive threshold and analgesia. *Life Sci* 31:1245–1248, 1982.
- Ohta T, Imagawa T, Ito S. Novel agonistic action of mustard oil on recombinant and endogenous porcine transient receptor potential V1 (pTRPV1) channels. *Biochem Pharmacol* 73:1646–1656, 2007.

- Ortiz MI, Granados-Soto V, Castañeda-Hernández G. The NO–cGMP–K⁺ channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin. *Pharmacol Biochem Behav* 76:187–195, 2003.
- Ossipov MH, Dussor GO, Porreca F. Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120:3779–3787, 2010.
- Pakulska W, Czarnecka E. Influence of oxcarbazepine on the antinociceptive action of morphine and metamizole in mice. *Acta Pol Pharm* 66:715–722, 2009.
- Pan HL, Khan GM, Alloway KD, Chen SR. Resiniferatoxin induces paradoxical changes in thermal and mechanical sensitivities in rats: mechanism of action. *J Neurosci* 23:2911–2919, 2003.
- Park U, Vastani N, Guan Y, Raja SN, Koltzenburg M, Caterina MJ. TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J Neurosci* 31:11425–11436, 2011.
- Peier AM, Moqrich A, Hergarden AC, Reeve AJ, Andersson DA, Story GM, Earley TJ, Dragoni I, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108:705–715, 2002a.
- Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S, Hogenesch JB, McIntyre P, Bevan S, Patapoutian A. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296:2046–2049, 2002b.
- Perl ER. Cutaneous polymodal receptors: characteristics and plasticity. *Prog Brain Res* 113:21–37, 1996.
- Perl ER, Kumazawa T, Lynn B, Kenins P. Sensitization of high threshold receptors with unmyelinated (C) afferent fibers. *Prog Brain Res* 43:263–277, 1976.
- Pertovaara A, Kaupila T, Hämäläinen MM. Influence of skin temperature on heat pain threshold in humans. *Exp Brain Res* 107:497–503, 1996.
- Pertwee RG. Cannabinoid receptors and pain. *Progress Neurobiol* 63:569–611, 2001.
- Peskar BM, Kluge S, Peskar BA, Soglowek SM, Brune K. Effects of pure enantiomers of flurbiprofen in comparison to racemic flurbiprofen on eicosanoid release from various rat organs ex vivo. *Prostaglandins* 42:515–531, 1991.
- Pethő G, Szolcsányi J. Systemically applied ruthenium red inhibits the stimulation of sensory receptors by capsaicin. *Acta Physiol Hung* 75 Suppl. 235–236, 1990.
- Pethő G, Szolcsányi J. Excitation of central and peripheral terminals of primary afferent neurons by capsaicin in vivo. *Life Sci* 58 (3) PL 47–53, 1996.
- Pethő G, Reeh PW. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol Rev* 92:1699–1775, 2012.
- Petrus M, Peier AM, Bandell M, Hwang SW, Huynh T, Olney N, Jegla T, Patapoutian A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain* 3:40, 2007.
- Pinedé I, Pollin B, Meert T, Plaghki L, Le Bars D. Psychophysics of a nociceptive test in the mouse: ambient temperature as a key factor for variation. *PLoS One* 7:e36699, 2012.
- Pini LA, Sandrini M, Vitale G. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. *Eur J Pharmacol* 308:31–40, 1996.
- Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception. *Pharmacol Ther* 112:440–456, 2006.
- Plone MA, Emerich DF, Lindner MD. Individual differences in the hotplate test and effects of habituation on sensitivity to morphine. *Pain* 66:265–270, 1996.
- Pogatzki EM, Raja SN. A mouse model of incisional pain. *Anesthesiology* 99:1023–1027, 2003.
- Pogatzki-Zahn EM, Shimizu I, Caterina M, Raja SN. Heat hyperalgesia after incision requires TRPV1 and is distinct from pure inflammatory pain. *Pain* 115:296–307, 2005.
- Pogorzala LA, Mishra SK, Hoon MA. The cellular code for mammalian thermosensation. *J Neurosci* 33:5533–5541, 2013.
- Pomonis JD, Harrison JE, Mark L, Bristol DR, Valenzano KJ, Walker K. N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-cholorophyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carboxamide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. In vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 306:387–393, 2003.
- Premkumar LS, Ahern GP. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature* 408:985–990, 2000.
- Premkumar LS, Qi ZH, Van Buren J, Raisinghani M. Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC-mediated phosphorylation of vanilloid receptor. *J Neurophysiol* 91:1442–1449, 2004.
- Price TJ, Cervero F, Gold MS, Hammond DL, Prescott SA. Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Res Rev* 60:149–170, 2009.
- Privitera R, Birch R, Sinisi M, Mihaylov IR, Leech R, Anand P. Capsaicin 8% patch treatment for amputation stump and phantom limb pain: a clinical and functional MRI study. *J Pain Res* 10:1623–1634, 2017.
- Raisinghani M, Zhong L, Jeffry JA, Bishnoi M, Pabbidi RM, Pimentel F, Cao DS, Evans MS, Premkumar LS. Activation characteristics of transient receptor potential ankyrin 1 and its role in nociception. *Am J Physiol Cell Physiol* 301:C587–C600, 2011.
- Ralevic V, Jerman JC, Brough SJ, Davis JB, Egerton J, Smart D. Pharmacology of vanilloids at recombinant and endogenous rat vanilloid receptors. *Biochem Pharmacol* 65:143–151, 2003.

- Rami HK, Thompson M, Stemp G, Fell S, Jerman JC, Stevens AJ, Smart D, Sargent B, Sanderson D, Randall AD, Gunthorpe MJ, Davis JB. Discovery of SB-705498: a potent, selective and orally bioavailable TRPV1 antagonist suitable for clinical development. *Bioorg Med Chem Lett* 16:3287–3291, 2006.
- Ramirez MR, Guterres L, Dickel OE, de Castro MR, Henriques AT, de Souza MM, Barros DM. Preliminary studies on the antinociceptive activity of *Vaccinium ashei* berry in experimental animal models. *J Med Food* 13:336–342, 2010.
- Randall RW, Eakins KE, Higgs GA, Salmon JA, Tateson JE. Inhibition of arachidonic acid cyclo-oxygenase and lipoxygenase activities of leukocytes by indomethacin and compound BW755C. *Agents Actions Suppl* 10:553–555, 1980.
- Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang SY, Nau C, Kress M. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci* 22:4740–4745, 2002.
- Reeh PW. Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation. *Neurosci Lett* 66:141–146, 1986.
- Reeh PW, Kocher L, Jung S. Does neurogenic inflammation alter the sensitivity of unmyelinated nociceptors in the rat? *Brain Res* 384:42–50, 1986.
- Reeh PW, Pethő G. Nociceptor excitation by thermal sensitization – a hypothesis. *Prog Brain Res* 129:39–50, 2000.
- Reid G, Babes A, Pluteanu F. A cold- and menthol-activated current in rat dorsal root ganglion neurones: properties and role in cold transduction. *J Physiol* 545:595–614, 2002.
- Reinert A, Treede R, Bromm B. The pain inhibiting pain effect: an electrophysiological study in humans. *Brain Res* 862:103–110, 2000.
- Rittner HL, Brack A, Machelska H, Mousa SA, Bauer M, Schäfer M, Stein C. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology* 95:500–508, 2001.
- Rittner HL, Labuz D, Schaefer M, Mousa SA, Schulz S, Schäfer M, Stein C, Brack A. Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. *FASEB J.* 20:2627–2629, 2006.
- Roby-Brami A, Bussel B, Willer JC, Le Bars D. An electrophysiological investigation into the pain-relieving effects of heterotopic nociceptive stimuli. Probable involvement of a supraspinal loop. *Brain* 110:1497–1508, 1987.
- Rowbotham MC, Nothaft W, Duan WR, Wang Y, Faltynek C, McGaraughty S, Chu KL, Svensson P. Oral and cutaneous thermosensory profile of selective TRPV1 inhibition by ABT-102 in a randomized healthy volunteer trial. *Pain* 152:1192–1200, 2011.
- Rueff A, Dray A. Sensitization of peripheral afferent fibres in the in vitro neonatal rat spinal cord-tail by bradykinin and prostaglandins. *Neuroscience* 54:527–535, 1993.
- Sanderson Nydahl K, Skinner K, Julius D, Basbaum AI. Co-localization of endomorphin-2 and substance P in primary afferent nociceptors and effects of injury: a light and electron microscopic study in the rat. *Eur J Neurosci* 19:1789–1799, 2004.
- Sandkühler J, Treier AC, Liu XG, Ohnismus M. The massive expression of c-fos protein in spinal dorsal horn neurons is not followed by long-term changes in spinal nociception. *Neurosci* 73:657–666, 1996.
- Sandrini M, Romualdi P, Capobianco A, Vitale G, Morelli G, Pini LA, Candeletti S. The effect of paracetamol on nociception and dynorphin A levels in the rat brain. *Neuropeptides* 35:110–116, 2001.
- Sándor Z, Varga A, Horváth P, Nagy B, Szolcsányi J. Construction of a stable cell line uniformly expressing the rat TRPV1 receptor. *Cell Mol Biol Lett* 10:499–514, 2005.
- Santicoli P, Bianco ED, Figini M, Bevan S, Maggi CA. Effect of capsazepine on the release of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity (CGRP-LI) induced by low pH, capsaicin and potassium in rat soleus muscle. *Br J Pharmacol* 110:609–612, 1993.
- Santos AR, Vedana EM, De-Freitas GA. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflamm Res* 47:302–307, 1998.
- Sauer SK, Schäfer D, Kress M, Reeh PW. Stimulated prostaglandin E2 release from rat skin, in vitro. *Life Sci* 62:2045–2055, 1998.
- Sauer SK, Bove GM, Averbeck B, Reeh PW. Rat peripheral nerve components release calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 in response to noxious stimuli: evidence that nervi nervorum are nociceptors. *Neurosci* 92:319–325, 1999.
- Sauer SK, Averbeck B, Reeh PW. Denervation and NK1 receptor block modulate stimulated CGRP and PGE2 release from rat skin. *Neuroreport* 11:283–286, 2000.
- Sauer SK, Reeh PW, Bove GM. Noxious heat-induced CGRP release from rat sciatic nerve axons in vitro. *Eur J Neurosci* 14:1203–1208, 2001.
- Savidge JR, Ranasinghe SP, Rang HP. Comparison of intracellular calcium signals evoked by heat and capsaicin in cultured rat dorsal root ganglion neurons and in a cell line expressing the rat vanilloid receptor VR1. *Neuroscience* 102:177–184, 2001.
- Sawada Y, Hosokawa H, Hori A, Matsumura K, Kobayashi S. Cold sensitivity of recombinant TRPA1 channels. *Brain Res* 1160:39–46, 2007.

- Schaffler K, Reeh P, Duan WR, Best AE, Othman AA, Faltynek CR, Locke C, Nothaft W. An oral TRPV1 antagonist attenuates laser radiant-heat-evoked potentials and pain ratings from UV(B)-inflamed and normal skin. *Br J Clin Pharmacol* 75:404–414, 2013.
- Schaible HG, Schmidt RF. Excitation and sensitization of fine articular afferents from cat's knee joint by prostaglandin E2. *J Physiol* 403:91–104, 1988.
- Schmelz M, Schmid R, Handwerker HO, Torebjörk HE. Encoding of burning pain from capsaicin-treated human skin in two categories of unmyelinated nerve fibres. *Brain* 123:560–571, 2000.
- Schnitzler K, Shutov LP, Van Kanegan MJ, Merrill MA, Nichols B, McKnight GS, Strack S, Hell JW, Usachev YM. Protein kinase A anchoring via AKAP150 is essential for TRPV1 modulation by forskolin and prostaglandin E2 in mouse sensory neurons. *J Neurosci* 28:4904–4917, 2008.
- Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* 134:1019–1029, 2008.
- Schuelert N, Just S, Kuelzer R, Corradini L, Gorham LC, Doods H. The somatostatin receptor 4 agonist J-2156 reduces mechanosensitivity of peripheral nerve afferents and spinal neurons in an inflammatory pain model. *Eur J Pharmacol* 746:274–281, 2015.
- Schuligoï R, Donnerer J, Amann R. Bradykinin-induced sensitization of afferent neurons in the rat paw. *Neurosci* 59:211–215, 1994.
- Seabrook GR, Sutton KG, Jarolimek W, Hollingworth GJ, Teague S, Webb J, Clark N, Boyce S, Kerby J, Ali Z, Chou M, Middleton R, Kaczorowski G, Jones AB. Functional properties of the high-affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist (4-hydroxy-5-iodo-3-methoxyphenylacetate ester) iodo-resiniferatoxin. *J Pharmacol Exp Ther* 303:1052–1060, 2002.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43:205–218, 1990.
- Seno N, Dray A. Capsaicin-induced activation of fine afferent fibres from rat skin in vitro. *Neurosci* 55:563–569, 1993.
- Sewell RD, Spencer PS. Antinociceptive activity of narcotic agonist and partial agonist analgesics and other agents in the tail-immersion test in mice and rats. *Neuropharmacology* 15:683–688, 1976.
- Shu X, Mendell LM. Acute sensitization by NGF of the response of small-diameter sensory neurons to capsaicin. *J Neurophysiol* 86:2931–2938, 2001.
- Silveri F, Morosini P, Brecciaroli D, Cervini C. Intra-articular injection of somatostatin in knee osteoarthritis: clinical results and IGF-1 serum levels. *Int J Clin Pharmacol Res* 14:79–85, 1994.
- Simone DA, Ngeow JY, Putterman GJ, LaMotte RH. Hyperalgesia to heat after intradermal injection of capsaicin. *Brain Res* 418:201–203, 1987.
- Simone DA, Kajander KC. Excitation of rat cutaneous nociceptors by noxious cold. *Neurosci Lett* 213:53–56, 1996.
- Simone DA, Nolano M, Johnson T, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR. Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: correlation with sensory function. *J Neurosci* 18:8947–8959, 1998.
- Sinclair JG, Main CD, Lo GF. Spinal vs supraspinal actions of morphine on the rat tail-flick reflex. *Pain* 33:357–362, 1988.
- Sluka KA. Systemic morphine in combination with TENS produces an increased antihyperalgesia in rats with acute inflammation. *J Pain* 1:204–211, 2000.
- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 129:227–230, 2000.
- Smith DL, D'Amour MC, D'Amour FE. The analgesic properties of certain drugs and drug combinations. *J Pharmacol Exp Ther* 77:184–193, 1943.
- Smith JAM, Davis CL, Burgess GM. Prostaglandin E2-induced sensitisation of bradykinin-evoked responses in rat dorsal root ganglion neurons is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. *Eur J Neurosci* 12:3250–3258, 2000.
- Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418:186–190, 2002.
- Souslova V, Cesare P, Ding Y, Akopian AN, Stanfa L, Suzuki R, Carpenter K, Dickenson A, Boyce S, Hill R, Nebunius-Oosthuizen D, Smith AJ, Kidd EJ, Wood JN. Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors. *Nature* 407:1015–1017, 2000.
- Sprenger C, Bingel U, Büchel C. Treating pain with pain: supraspinal mechanisms of endogenous analgesia elicited by heterotopic noxious conditioning stimulation. *Pain* 152:428–439, 2011.
- St Pierre M, Reeh PW, Zimmermann K. Differential effects of TRPV channel block on polymodal activation of rat cutaneous nociceptors in vitro. *Exp Brain Res* 196:31–44, 2009.
- Staaf S, Franck MC, Marmigère F, Mattsson JP, Ernfors P. Dynamic expression of the TRPM subgroup of ion channels in developing mouse sensory neurons. *Gene Expr Patterns* 10:65–74, 2010.

- Steen KH, Reeh PW, Anton F, Handwerker HO. Protons selectively induce lasting excitation and sensitisation to mechanical stimulation of nociceptors in the rat skin, in vitro. *J Neurosci* 12:86–95, 1992.
- Steen KH, Steen AE, Reeh PW. A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitisation of nociceptors in rat skin, in vitro. *J Neurosci* 15:3982–3993, 1995.
- Stein C, Millan MJ, Yassouridis A, Herz A. Antinociceptive effects of mu- and kappa-agonists in inflammation are enhanced by a peripheral opioid receptor-specific mechanism. *Eur J Pharmacol* 155:255–264, 1988.
- Stein C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N Engl J Med* 332:1685–1690, 1995.
- Stein C, Clark JD, Oh U, Vasko MR, Wilcox GL, Overland AC, Vanderah TW, Spencer RH. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. *Brain Res Rev* 60:90–113, 2009.
- Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112:819–829, 2003.
- Straub I, Krügel U, Mohr F, Teichert J, Rizun O, Konrad M, Oberwinkler J, Schaefer M. Flavanones that selectively inhibit TRPM3 attenuate thermal nociception in vivo. *Mol Pharmacol* 84:736–750, 2013a.
- Straub I, Mohr F, Stab J, Konrad M, Philipp SE, Oberwinkler J, Schaefer M. Citrus fruit and fabacea secondary metabolites potently and selectively block TRPM3. *Br J Pharmacol* 168:1835–1850, 2013b.
- Stucky CL, Lewin GR. Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J Neurosci* 19:6497–6505, 1999.
- Suardíaz M, Estivill-Torrús G, Goicoechea C, Bilbao A, Rodríguez de Fonseca F. Analgesic properties of oleoylethanolamide (OEA) in visceral and inflammatory pain. *Pain* 133:99–110, 2007.
- Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J Neurophysiol* 88:544–548, 2002.
- Sugiura T, Bielefeldt K, Gebhart GF. TRPV1 function in mouse colon sensory neurons is enhanced by metabotropic 5-hydroxytryptamine receptor activation. *J Neurosci* 24:9521–9530, 2004.
- Suzuki M, Mizuno A, Kodaira K, Imai M. Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* 278:22664–22668, 2003.
- Sycha T, Gustorff B, Lehr S, Tanew A, Eichler HG, Schmetterer L. A simple pain model for the evaluation of analgesic effects of NSAIDs in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 56:165–172, 2003.
- Szállási Á, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51:159–212, 1999.
- Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A. Sensory effect of capsaicin congeners. I. Relationship between chemical structure and pain-producing potency. *Arzneim Forsch Drug Res* 25:1877–1881, 1975.
- Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A, Joó F. Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *N-S Arch Pharmacol* 287:157–169, 1975.
- Szolcsányi J. On the specificity of pain producing and sensory neuron blocking effect of capsaicin. In: Knoll J, Vizi ES (eds.) Symposium on analgesics. Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 167–172, 1976.
- Szolcsányi J. A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. *J Physiol (Paris)* 73:251–259, 1977.
- Szolcsányi J. Sensory receptors and the antinociceptive effects of capsaicin. In: Hakanson R, Sundler F (eds.) Tachykinin Antagonists. Elsevier, Amsterdam, pp. 45–54, 1985.
- Szolcsányi J. Selective responsiveness of polymodal nociceptors of the rabbit ear to capsaicin, bradykinin and ultra-violet irradiation. *J Physiol (Lond)* 388:9–23, 1987a.
- Szolcsányi J. Capsaicin and nociception. *Acta Physiol Hung* 69:323–332, 1987b.
- Szolcsányi J, Anton F, Reeh PW, Handwerker HO. Selective excitation by capsaicin of mechano-heat sensitive nociceptors in rat skin. *Brain Res* 446:262–268, 1988.
- Szolcsányi J, Szállási A, Szállási Z, Joó F, Blumberg PM. Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 255:923–928, 1990.
- Szolcsányi J. Capsaicin, irritation and desensitization: neurophysiological basis and future perspectives. In: Green BG, Mason JR, Kare MR (eds.) Chemical Senses. Vol. 2. Irritation. Marcel Dekker, New York, pp. 141–168, 1990.
- Szolcsányi J. Actions of capsaicin on sensory receptors. In: Wood J (ed.) Capsaicin in the Study of Pain. Academic Press, London, pp. 1–26, 1993.
- Szolcsányi J, Helyes Z, Oroszi G, Németh J, Pintér E. Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *Br J Pharmacol* 123:936–942, 1998a.
- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z, Oroszi G, Németh J. Systemic anti-inflammatory effect induced by counter-irritation through a local release of somatostatin from nociceptors. *Br J Pharmacol* 125:916–922, 1998b.
- Szolcsányi J. Anandamide and the question of its functional role for activation of capsaicin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21:203–204, 2000.
- Szolcsányi J. Capsaicin receptors as target molecules on nociceptors for development of novel analgesic agents. In: Kéri G, Tóth J (eds.) Molecular Pathomechanisms and New Trends in Drug Research. Taylor and Francis, New York, pp. 319–333, 2002.

- Szolcsányi, J., Barthó, L., Pethő, G.: Capsaicin-sensitive bronchopulmonary receptors with dual sensory-efferent function: mode of action of capsaicin antagonists. *Acta Physiol Hung* 77:293-304, 1991.
- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z. Sensocrine function of capsaicin-sensitive nociceptors mediated by somatostatin regulates against inflammation and hyperalgesia. In: Brune K, Handwerker HO (eds.) *Hyperalgesia: molecular mechanisms and clinical implications*. Progress in Pain Research and Management 30. IASP Press, Seattle, pp. 113–128, 2004.
- Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Z, Pethő G. Inhibition of the function of TRPV1-expressing nociceptive sensory neurons by somatostatin 4 receptor agonism: mechanism and therapeutical implications. *Curr Top Med Chem* 11:2253–2263, 2011.
- Szolcsányi J, Sándor Z. Multimeric TRPV1 nocisensor: a target for analgesics, *Trends Pharmacol Sci.* 33:646–655, 2012.
- Szolcsányi J, Pintér E. Transient receptor potential vanilloid 1 as a therapeutic target in analgesia. *Expert Opin Ther Targets* 17:641–657, 2013.
- Szolcsányi J. Capsaicin and sensory neurones: a historical perspective. In: Capsaicin as a therapeutic molecule. In: Abdel-Salam OME (ed.) *Progress in Drug Research*. pp. 1–37, 2014.
- Szőke É, Balla Z, Csernoch L, Czéh G, Szolcsányi J. Interacting effects of capsaicin and anandamide on intracellular calcium in sensory neurons. *Neuroreport* 11:1949–1952, 2000.
- Tabrizi MA, Baraldi PG, Baraldi S, Gessi S, Merighi S, Borea PA. Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Clinical Implications of TRPV1 Receptor Antagonists. *Med Res Rev* 37:936–983, 2017.
- Taiwo YO, Levine D. Effects of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism on cutaneous nociceptive threshold in the rat. *Brain Res* 537:372–374, 1990.
- Takashima Y, Daniels RL, Knowlton W, Teng J, Liman ER, McKemy DD. Diversity in the neural circuitry of cold sensing revealed by genetic axonal labeling of transient receptor potential melastatin 8 neurons. *J Neurosci* 27:14147–14157, 2007.
- Takayama Y, Uta D, Furue H, Tominaga M. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:5213–5218, 2015.
- Tang L, Chen Y, Chen Z, Blumberg PM, Kozikowski AP, Wang ZJ. Antinociceptive pharmacology of N-(4-chlorobenzyl)-N'-(4-hydroxy-3-iodo-5-methoxybenzyl) thiourea, a high-affinity competitive antagonist of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 321:791–798, 2007.
- Thayer SA, Perney TM, Miller RJ. Regulation of calcium homeostasis in sensory neurons by bradykinin. *J Neurosci* 8:4089–4097, 1988.
- Tillman DB, Treede RD, Meyer RA, Campbell JN. Response of C fibre nociceptors in the anaesthetized monkey to heat stimuli: correlation with pain threshold in humans. *J Physiol* 485:767–774, 1995a.
- Tillman DB, Treede RD, Meyer RA, Campbell JN. Response of C fibre nociceptors in the anaesthetized monkey to heat stimuli: estimates of receptor depth and threshold. *J Physiol* 485:753–765, 1995b.
- Tjølsen A, Rosland JH, Berge OG, Hole K. The increasing-temperature hot-plate test: an improved test of nociception in mice and rats. *J Pharmacol Methods* 25:241–250, 1991.
- Todaka H, Taniguchi J, Satoh J, Mizuno A, Suzuki M. Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J Biol Chem* 279:35133–35138, 2004.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21:531–543, 1998.
- Tominaga M, Wada M, Masu M. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6951–6956, 2001.
- Tonussi CR, Ferreira SH. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. *Eur J Pharmacol* 251:173–179, 1994.
- Torebjörk HE, Lundberg LE, LaMotte RH. Central changes in processing of mechanoreceptive input in capsaicin-induced secondary hyperalgesia in humans. *J Physiol* 448:765–780, 1992.
- Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol* 38:397–421, 1992.
- Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN. Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J Physiol* 483:747–758, 1995.
- Trevisani M, Gatti R. TRPV1 antagonists as analgesic agents. *Open Pain J* 6:108–118, 2013.
- Ueda H, Inoue M, Yoshida A, Mizuno K, Yamamoto H, Maruo J, Matsuno K, Mita S. Metabotropic neurosteroid/sigma-receptor involved in stimulation of nociceptor endings of mice. *J Pharmacol Exp Ther* 298:703–710, 2001.
- Udem BJ, Kollarik M. Characterization of the vanilloid receptor 1 antagonist iodo-resiniferatoxin on the afferent and efferent function of vagal sensory C-fibers. *J Pharmacol Exp Ther* 303:716–722, 2002.
- Urata K, Shinoda M, Honda K, Lee J, Maruno M, Ito R, Gionhaku N, Iwata K. Involvement of TRPV1 and TRPA1 in incisional intraoral and extraoral pain. *J Dent Res* 94:446–454, 2015.
- Urban L, Dray A. Capsazepine, a novel capsaicin antagonist, selectively antagonises the effects of capsaicin in the mouse spinal cord in vitro. *Neurosci Lett* 134:9–11, 1991.

- Valenzano KJ, Grant ER, Wu G, Hachicha M, Schmid L, Tafesse L, Sun Q, Rotshteyn Y, Francis J, Limberis J, Malik S, Whitemore ER, Hodges D. N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carboxamide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: I. In vitro characterization and pharmacokinetic properties. *J Pharmacol Exp Ther* 306:377–386, 2003.
- Van Hees J, Gybels JC nociceptor activity in human nerve during painful and non painful skin stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44:600–607, 1981.
- Vasko MR, Campbell WB, Waite KJ. Prostaglandin E₂ enhances bradykinin-stimulated release of neuropeptides from rat sensory neurons in culture. *J Neurosci* 14:4987–4997, 1994.
- Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* 534:813–825, 2001.
- Vierck CJ, Cooper BY. Guideline for assessing pain reactions and pain modulation in laboratory animal subjects. In: Kruger L, Liebeskind JC (eds.) *Advances in Pain Research and Therapy*. Vol 6. Raven Press, New York, pp 305–322, 1984.
- Vítková J, Loučka M, Boček J, Vaculín S. The effect of acclimatization and ambient temperature on heat withdrawal threshold in rats. *Eur J Pain* 19:21–27, 2015.
- Vogel HG, Vogel WH. *Drug Discovery and Evaluation. Pharmacological Assays*. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, 1997.
- Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T. TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 12:482–494, 2011.
- Vyklický L, Vlachová V, Vitasková Z, Dittert I, Kabát M, Orkand RK. Temperature coefficient of membrane currents induced by noxious heat in sensory neurones in the rat. *J Physiol (Lond.)* 517:181–192, 1999.
- Wahl P, Foged C, Tullin S, Thomsen C. Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist. *Mol Pharmacol* 59:9–15, 2001.
- Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, McIntyre P. The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 304:56–62, 2003.
- Wang X, Miyares RL, Ahern GP. Oleoylethanolamide excites vagal sensory neurones, induces visceral pain and reduces short-term food intake in mice via capsaicin receptor TRPV1. *J Physiol* 564:541–547, 2005.
- Wang ZY, Wang P, Merriam FV, Bjorling DE. Lack of TRPV1 inhibits cystitis-induced increased mechanical sensitivity in mice. *Pain* 139:158–167, 2008.
- Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem* 277:47044–47051, 2002.
- Wei H, Karimaa M, Korjamo T, Koivisto A, Pertovaara A. Transient receptor potential ankyrin 1 ion channel contributes to guarding pain and mechanical hypersensitivity in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology* 117:137–148, 2012.
- Weinreich D, Koschorke GM, Udem BJ, Taylor GE. Prevention of the excitatory actions of bradykinin by inhibition of PGI₂ formation in nodose neurones of the guinea-pig. *J Physiol (Lond.)* 483:735–746, 1995.
- Werle M, Bernkop-Schnürch A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids* 30:351–367, 2006.
- Willis Jr. WD. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res* 124:395–421, 1999.
- Winder CV, Pfeiffer CC, Maison GL. The nociceptive contraction of the cutaneous muscle of the guinea pig as elicited by radiant heat with observations on the mode of action of morphine. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 72:329–359, 1946.
- Woo YC, Park SS, Subieta AR, Brennan TJ. Changes in tissue pH and temperature after incision indicate acidosis may contribute to postoperative pain. *Anesthesiology* 101:468–475, 2004.
- Woodbury CJ, Zwick M, Wang S, Lawson JJ, Caterina MJ, Koltzenburg M, Albers KM, Koerber HR, Davis BM. Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses. *J Neurosci* 24:6410–6415, 2004.
- Woolfe G, MacDonald AL. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *J Pharmacol Exp Ther* 80:300–307, 1944.
- Wu ZZ, Chen SR, Pan HL. Transient receptor potential vanilloid type 1 activation down-regulates voltage-gated calcium channels through calcium-dependent calcineurin in sensory neurons. *J Biol Chem* 280:18142–18151, 2005.
- Wu C, Gavva NR, Brennan TJ. Effect of AMG0347, a transient receptor potential type V1 receptor antagonist, and morphine on pain behavior after plantar incision. *Anesthesiology* 108:1100–1108, 2008.
- Xing H, Ling J, Chen M, Gu JG. Chemical and cold sensitivity of two distinct populations of TRPM8-expressing somatosensory neurons. *J Neurophysiol.* 95:1221–1230, 2006.
- Xu XJ, Farkas-Szállási T, Lundberg JM, Hökfelt T, Wiesenfeld-Hallin Z, Szállási A. Effects of the capsaicin analogue resiniferatoxin on spinal nociceptive mechanisms in the rat: behavioral, electrophysiological and in situ hybridization studies. *Brain Res* 752:52–60, 1997.

- Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418:181–186, 2002.
- Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK, Oh U. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* 455:1210–1215, 2008.
- Yarnitsky D, Ochoa JL. Studies of heat pain sensation in man: perception thresholds, rate of stimulus rise and reaction time. *Pain* 40:85–91, 1990.
- Yarnitsky D, Simone DA, Dotson RM, Cline MA, Ochoa JL. Single C nociceptor responses and psychophysical parameters of evoked pain: effect of rate of rise of heat stimuli in humans. *J Physiol* 450:581–592, 1992.
- Yeomans DC, Proudfit HK. Characterization of the foot withdrawal response to noxious radiant heat in the rat. *Pain* 59:85–94, 1994.
- Yeomans DC, Pirec V, Proudfit HK. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors of the rat: behavioral evidence. *Pain* 68:133–140, 1996.
- Yeomans DC, Proudfit HK. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: electrophysiological evidence. *Pain* 68:141–150, 1996.
- Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, Tominaga M, Shimizu S, Sato Y, Mori Y. Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chem Biol* 2:596–607, 2006.
- Zahn PK, Brennan TJ. Primary and secondary hyperalgesia in a rat model for human postoperative pain. *Anesthesiology* 90:863–872, 1999.
- Zahn PK, Pogatzki EM, Brennan TJ. Mechanisms for pain caused by incisions. *Reg Anesth Pain Med* 27:514–516, 2002.
- Zhao M, Isami K, Nakamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Acute cold hypersensitivity characteristically induced by oxaliplatin is caused by the enhanced responsiveness of TRPA1 in mice. *Mol Pain* 8:55, 2012.
- Zheng T, Kakimura J, Matsutomi T, Nakamoto C, Ogata N. Prostaglandin E2 has no effect on two components of tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in mouse dorsal root ganglion. *J Pharmacol Sci* 103:93–102, 2007.
- Zhou Y, Zhou ZS, Zhao ZQ. PKC regulates capsaicin-induced currents of dorsal root ganglion neurons in rats. *Neuropharmacol* 41:601–608, 2001.
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110, 1983.
- Zimmermann K, Reeh PW, Averbeck B. ATP can enhance the proton induced CGRP release through P2Y receptors and secondary PGE2 release in isolated rat dura mater. *Pain* 97:259–265, 2002.
- Zimmermann K, Leffler A, Fischer MM, Messlinger K, Nau C, Reeh PW. The TRPV1/2/3 activator 2-aminoethoxydiphenyl borate sensitizes native nociceptive neurons to heat in wildtype but not TRPV1 deficient mice. *Neurosci* 135:1277–1284, 2005.
- Zimmermann K, Lennerz JK, Hein A, Link AS, Kaczmarek JS, Delling M, Uysal S, Pfeifer JD, Riccio A, Clapham DE. Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 5 (TRPC5) is a cold-transducer in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:18114–18119, 2011.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sörgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452–457, 1999.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindenekelőtt **Szolcsányi János** akadémikusnak, aki mesteremként irányította kutatómunkámat végzésem óta. Tőle elsősorban lényeglátást, a megoldáskeresés igényét és kitartást tanultam. Kreativitását csak csodálni tudtam, elsajátítani sajnos nem. Köszönettel tartozom **Barthó Loránd** professzornak, aki felkeltette érdeklődésemet a kísérletes kutatómunka iránt, és diákköri munkámat irányította. Támogatását pályafutásom során végig éreztem. Kettőjüknek mint intézetvezetőknek is köszönetet szeretnék mindani, akik mindenben támogatták munkámat. Ugyanez vonatkozik **Pintér Erika** professzorra is, aki nemcsak jelenlegi intézetvezetőként, hanem kollaborációs partnerként és nem utolsósorban barátként végig támogatott. Köszönettel tartozom dr. **Bölskei Kata** munkatársamnak, aki a kísérletes munkában és a kéziratok megírásában rengeteget segített. Rajta kívül két további volt PhD-hallgatómat, **dr. Almási Róbertet** és **dr. Füredi Rékát** illeti köszönet több kísérletsorozatban való alkotó közreműködésükért. Egy-egy projektben való együttműködésért köszönet illeti **Helyes Zsuzsanna** professzort, **dr. Varga Angelikát**, **dr. Sándor Zoltánt**, **dr. Szőke Évát**, **dr. Boros Melindát**, **dr. Tékus Valériát**. Az intézeti asszisztensek közül **Góglné Keserű Katalinnak** és **Bagoly Teréznek** szeretnék köszönetet mondani odaadó és precíz munkájukért. A disszertáció elkészítésében nyújtott technikai segítségért **Schweibert Istvánt** illeti köszönet. Végül, de nem utolsósorban hálás vagyok **feleségemnek** támogatásáért és türelméért.

Külföldi kollaborációs partnereim közül köszönet illeti **Peter Reeh** professzort (Erlangen, Németország), akivel igen gyümölcsöző együttműködést sikerült kialakítani. Az erlangeni munkacsoportból szeretnék még köszönetet mondani **Alexandra Derow** PhD hallgatónak és **Iwona Izydorczyk** asszisztensnőnek is.

Köszönet az **OTKA**-nak, az **ETT**-nek és a **Humboldt Alapítványnak** a kutatásokhoz nyújtott anyagi támogatásért.